



**Alexandra Filipa Andrade da Silva**

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

## **Estudo da Displasia do Cotovelo da Raça Canina**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Doutora Micaela Fonseca,  
Faculdade de Ciências e Tecnologias,  
Universidade Nova de Lisboa

Co-Orientador: Prof. Doutor Mauro Guerra,  
Faculdade de Ciências e Tecnologias,  
Universidade Nova de Lisboa



Estudo da Displasia do Cotovelo da Raça Canina

Direitos de Cópia © Alexandra Filipa Andrade da Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



Ao meu avô Adriano Andrade



# Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, Afonso Silva e Maria Andrade, e à minha "mana", Daniela Silva, porque a eles devo tudo o que sou e tudo o que tenho. Sem eles nunca teria cá chegado.

Aos meus orientadores, Doutora Micaela Fonseca e Doutor Mauro Guerra, devo-lhes um profundo e carinhoso agradecimento. Um muito obrigada por toda a orientação prestada, pela disponibilidade, pela clareza dos esclarecimentos e principalmente, por sempre me terem feito sentir que eu era capaz e ia conseguir.

Ao Doutor Martinho Capelão devo também um enorme agradecimento pela atenção que me deu e pela predisposição em contribuir da melhor forma possível neste trabalho.

Às minhas colegas de laboratório, Adriana Costa, Inês Ramos e Marta Carvalho só posso dizer que sem vocês tudo teria sido mais difícil. Agradeço-vos encarecidamente por toda a ajuda que me deram nesta jornada. Quero ainda agradecer à Inês e Marta pelo companheirismo e amizade fora do laboratório. Vocês, juntamente com a Carina Figueira, estiveram presentes em todos os momentos.

Às minha companheiras de casa e amigas, Andreia Serrano ("madrinha") e Sara Serrano, devo-vos tanto por terem-me animado naquelas alturas más, naqueles momentos de desespero. Muito obrigada, mesmo, pela vossa força e carinho.





# Resumo

A displasia do cotovelo é caracterizada por um desenvolvimento anormal da articulação do cotovelo que ocorre com frequência em cães de raças de médio e grande porte a partir dos 4 a 6 meses. É um termo genérico para um conjunto de patologias: osteocondrite dissecante do côndilo umeral, não união do processo ancóneo, incongruência articular do cotovelo e fragmentação do processo coronóide medial. Esta última é a lesão mais comum da displasia do cotovelo e pode ser causada por vários fatores, nomeadamente má formação óssea, doenças genéticas, influências nutricionais e mecânicas. Com o objectivo de alcançar um maior conhecimento acerca da patogênese da doença, e assim poder ser aplicada uma terapia mais eficiente, direccionada e económica, realizou-se o estudo elemental de processos coronóides saudáveis e doentes.

Técnicas de análise por feixe, nomeadamente  $\mu$ -XRF e PIGE foram usadas para determinar a concentração de elementos maioritários e traço nos coronóides, com o intuito de encontrar alguma alteração nas amostras doentes comparativamente às saudáveis. Neste estudo pretendia-se também estudar o impacto do formol e da água oxigenada no tratamento de amostras, nomeadamente cabeças de fémur.

A técnica de PIGE permitiu-nos apenas uma análise qualitativa enquanto que através de  $\mu$ -XRF foi possível verificar que o formol e a água oxigenada não alteraram as amostras de cabeças de fémur. Relativamente aos processos coronóides, verificou-se uma diminuição da concentração de Sr e por outro lado, um aumento da concentração de Zn nos coronóides doentes em comparação com os saudáveis.



# Abstract

The elbow dysplasia is characterized by an abnormal development of the elbow joint that occurs frequently in dogs aged between 4 and 6 months of medium and large size races. It is a generic term for a set of conditions: osteochondritis dissecans of the humeral condyle, ununited anconeal process, joint incongruity of the elbow and fragmentation of the medial coronoid process. The last one is the most common injury of the elbow dysplasia and can be caused by several factors, including bone malformation, genetic diseases, nutritional and mechanical effects. In order to achieve a better knowledge of the pathogenesis of the disease, and thus apply a more efficient, targeted and economic therapy were performed elementary studies in healthy and unhealthy coronoid processes.

Analytical beam techniques,  $\mu - XRF$  and PIGE were used to determine the concentration of majority and trace elements on the coronoid, in order to find some alterations in ill samples compared to healthy. In this study, it was also intended to study the impact of formaldehyde and hydrogen peroxide in sample handling, particularly femoral head.

PIGE allowed only a qualitative analysis while using  $\mu - XRF$  we found that formaldehyde and hydrogen peroxide did not alter the samples of femoral heads. For coronoides processes, there was a decrease in the concentration of Sr and on the other hand, an increase in the Zn concentration in unhealthy coronoid processes compared to healthy.



# Conteúdo

Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de figuras	xvii
Lista de tabelas	xix
Lista de Símbolos	xxi
Lista de Acrónimos	xxiii
1 Introdução	1
2 Estruturas Ósseas do Cotovelo	3
2.1 Úmero . . . . .	4
2.2 Rádio . . . . .	4
2.3 Cúbito . . . . .	5
3 Displasia do Cotovelo	7
3.1 Osteocondrite Dissecante do Côndilo Umeral . . . . .	7
3.2 Não União do Processo Ancóneo . . . . .	8
3.3 Incongruência Articular do Cotovelo . . . . .	8
3.4 Fragmentação do Processo Coronóide . . . . .	9
3.5 Estado da Arte . . . . .	10
4 Espectroscopia de Raios-X	13
4.1 Raios-X . . . . .	13
4.1.1 Descoberta dos Raios-X . . . . .	13

4.1.2	Produção dos Raios-X . . . . .	13
4.2	Interação dos Raios-X com a Matéria . . . . .	15
4.2.1	Absorção . . . . .	15
4.2.2	Dispersão . . . . .	17
4.3	Micro - Fluorescência de Raios-X ( $\mu - XRF$ ) . . . . .	19
4.3.1	Tubo de Raios-X . . . . .	19
4.3.2	Sistema Ótico . . . . .	21
4.3.3	Geometria de Excitação . . . . .	21
4.3.4	Detetor . . . . .	22
4.3.5	Análise Espectral . . . . .	23
4.3.6	Análise Quantitativa . . . . .	25
4.3.7	Incertezas Associadas . . . . .	26
5	Emissão de Radiação Gama Induzida por Protões . . . . .	27
5.1	Reações Nucleares . . . . .	27
5.2	PIGE . . . . .	28
5.2.1	Secção Eficaz . . . . .	29
5.2.2	Poder de Paragem . . . . .	30
5.2.3	Ressonâncias . . . . .	31
5.2.4	ERYA . . . . .	32
6	Procedimento Experimental . . . . .	35
6.1	Preparação das Amostras . . . . .	35
6.1.1	Ossos da Articulação do Cotovelo Canino . . . . .	35
6.1.2	Cabeças de Fémur . . . . .	37
6.2	Análise Qualitativa e Quantitativa . . . . .	39
6.2.1	$\mu - XRF$ . . . . .	39
6.2.2	PIGE . . . . .	43
7	Resultados e Discussão . . . . .	45
7.1	Cabeças de Fémur . . . . .	45
7.2	Ossos da Articulação do Cotovelo Canino . . . . .	47
8	Conclusões e Perspetivas Futuras . . . . .	53

Bibliografia

55





# Lista de Figuras

2.1	Projeção mediolateral da extensão do cotovelo . . . . .	3
2.2	Vistas Cranial e Caudal do Côndilo do Úmero . . . . .	4
2.3	Representação Da Cabeça do Rádio . . . . .	5
2.4	Vistas Antero-Posterior e Lateral do Cúbito . . . . .	5
3.1	Representação da NUPA . . . . .	8
3.2	Representação da FPCM . . . . .	9
4.1	Emissão de Radiação Bremsstrahlung . . . . .	14
4.2	Emissão de Raio-X e do eletrão de Auger . . . . .	15
4.3	Absorção Fotoelétrica e Fluorescência de Raios-X . . . . .	16
4.4	Coeficiente de absorção em função da Energia . . . . .	17
4.5	Dispersão de Compton . . . . .	18
4.6	Tubo de Raios-X . . . . .	20
4.7	Ótica dos Raios-X . . . . .	21
4.8	Geometria de Excitação . . . . .	22
4.9	Visualização da largura a meia altura . . . . .	23
4.10	Representação de um espectro medido . . . . .	24
4.11	Representação da Radiação de Bremsstrahlung dispersa e dos picos de Campton e Rayleigh . . . . .	25
4.12	Reta de Calibração para o P . . . . .	25
5.1	Dispersão Nuclear e de Coulomb . . . . .	27
5.2	Geometria de uma Reação Nuclear . . . . .	29
5.3	Representação da Transmissão de Partículas por um Alvo Fino . . . . .	30
5.4	Ressonâncias na Função de Excitação . . . . .	31

---

6.1	Fotografia da Amostra Controlo . . . . .	36
6.2	Montagem de Slide com Folha de Mylar . . . . .	37
6.3	Fotografia da Máquina de Corte da Faculdade de Medicina Dentária . . . . .	37
6.4	Amostras Cortadas de Cabeça de Fémur . . . . .	38
6.5	Porta Amostras da Câmara da Linha de Reações Nucleares do Acelerador Tandem . .	39
6.6	Ajuste de um Espectro . . . . .	40
6.7	Exemplo de Quantificação . . . . .	41
7.1	Dados obtidos das Amostras de Fémur de Gato . . . . .	47
7.2	Dados obtidos das Amostras Doentes e de Controlo do Cotovelo Canino . . . . .	48
7.3	Dados Obtidos Para as Amostras Doentes e de Controlo Pastilhadas . . . . .	51

# Lista de Tabelas

3.1	Representação do ranking da OFA (Orthopedics Foundation for Animal) relativo à incidência da displasia do cotovelo em diferentes raças (adaptado da Ref. [2]). . . . .	10
6.1	Representação dos valores medidos e certificados da amostra padrão BONE ASH. . . .	42
6.2	Representação dos valores medidos e certificados da amostra padrão BONE MEAL. .	42
6.3	Representação dos valores medidos e certificados da amostra padrão NYS RM 05-02 Bovine Bone. . . . .	42
6.4	Representação dos valores medidos e certificados da amostra padrão NYS RM 05-04 Caprine Bone. . . . .	43
7.1	Comparação da concentração elemental das cabeças de fémur em água destilada e em formol obtida através de $\mu - XRF$ . . . . .	45
7.2	Valores obtidos dos rendimentos experimentais do P e Al através da técnica de PIGE para uma energia de 3006,7 keV. . . . .	46
7.3	Valores obtidos dos rendimentos experimentais do P, Al, $^{197}F$ , $^{110}F$ , Na e Mg através da técnica de PIGE para uma energia de 2788,2 keV. . . . .	46
7.4	Valores obtidos para a razão Ca/P. . . . .	48
7.5	Comparação dos valores de concentração obtidos, em $\mu g.g^{-1}$ , para as amostras no estado normal e pastilhado. . . . .	49
7.6	Valores obtidos dos rendimentos experimentais da amostra de controlo através da técnica de PIGE, para uma energia de 2788 keV. . . . .	51
7.7	Valores obtidos dos rendimentos experimentais da amostra doente em água oxigenada através da técnica de PIGE, para uma energia de 3006,7 keV. . . . .	52



# Lista de Símbolos

$A$	Massa Atômica
$Al$	Alumínio
$Be$	Berílio
$b$	Parâmetro de Impacto
$Ca$	Cálcio
$Cu$	Cobre
$c$	Velocidade da Luz
$E$	Energia
$E_0$	Energia Incidente
$E_R$	Energia de Ressonância
$F$	Flúor
$Fe$	Ferro
$h$	Constante de Planck
$I$	Intensidade
$I_0$	Intensidade Inicial
$K$	Potássio
$N_{AV}$	Número de Avogadro
$Na$	Sódio
$Mg$	Magnésio
$Mn$	Manganês
$m_e$	Massa do Elétron
$P$	Fósforo
$Pb$	Chumbo
$Rh$	Ródio
$Sr$	Estrôncio
$Z$	Número Atômico
$Zn$	Zinco
$\lambda$	Comprimento de Onda
$\mu$	Coefficiente de Atenuação Linear
$\rho$	Densidade Mássica
$\tau$	Absorção Fotoelétrica
$\sigma$	Dispersão
$\frac{d\sigma}{d\Omega}$	Secção Eficaz Diferencial

$\varepsilon$	Seção Eficaz de Paragem
$\varepsilon_{\text{abs}}$	Eficiência Absoluta do Sistema
$\Gamma$	Largura Natural do Estado

# Lista de Siglas e Acrónimos

DC	Displasia do Cotovelo
ERYA	Emitted Radiation Yield Analysis
FWHM	Full Width Half Maximum
FPCM	Fragmentação do Processo Coronoide Medial
IAC	Incongruência Articular do Cotovelo
IBA	Ion Beam Analysis
NUPA	Não União do Processo Ancóneo
ODCU	Osteocondrite Dissecante do Côndilo Umeral
OA	Osteoartrose
PA	Processo Ancóneo
PIGE	Emissão de Radiação Gama Induzida por Protões
SDD	Silicon Drift Detector
TC	Tomografia Computadorizada
XRF	Fluorescência de Raios-X
$\mu$ - XRF	Micro Fluorescência de Raios-X





# Capítulo 1

## Introdução

A displasia do cotovelo (DC) canino é o distúrbio mais comum no desenvolvimento da articulação do cotovelo e resulta na claudicação dos membros anteriores em cães de raça de médio e grande porte. A DC é caracterizada pelas seguintes condições: fragmentação do processo coronóide medial (FPCM), osteocondrite dissecante do côndilo umeral (ODCU), não união do processo ancóneo (NUPA) e incongruência articular do cotovelo (IAC). Cada uma destas condições pode causar osteoartrose (OA) irreversível do cotovelo, devido a danos na cartilagem, instabilidade articular e sinovite (inflamação do tecido que reveste a articulação) crónica [1].

A FPCM é a mais frequente forma de displasia do cotovelo diagnosticada em cães [2] e, por essa razão a presente dissertação incide nesta patologia. Normalmente o diagnóstico com total certeza da FPCM é difícil e é baseado no exame clínico e em técnicas de imagem. São utilizadas a radiografia e outras modalidades que são dispendiosas, como a tomografia computadorizada, ressonância magnética e a artroscopia [3]. A artroscopia é utilizada para o diagnóstico definitivo e tratamento cirúrgico que consiste na remoção de fragmentos, osso displástico e cartilagem, através de curetagem e ostectomia parcial [1].

No presente trabalho pretende-se fazer a análise da composição elemental dos fragmentos removidos através da artroscopia, com o intuito de contribuir para um maior conhecimento acerca da doença. Uma vez que a FPCM apresenta um difícil e caro diagnóstico, e que o seu tratamento é também dispendioso, um melhor conhecimento acerca dos mecanismos e causas que levam ao seu aparecimento é crucial para ser estabelecida uma terapia mais eficaz e direcionada. Se a doença tiver uma componente ambiental associada, os fragmentos removidos durante a cirurgia apresentarão variações nas concentrações dos elementos traço (que existem em muita baixa concentração) e elementos maioritários. Deste modo, o objetivo desta dissertação é a comparação qualitativa e quantitativa de fragmentos provenientes da articulação doente com ossos de controlo. Pretende-se ainda, verificar se a forma como os ossos são conservados até posterior análise pode ou não interferir nos resultados obtidos. Assim sendo, serão analisadas cabeças de fémur que foram armazenadas em diferentes soluções: formol, água oxigenada e água destilada.

Utilizaram-se duas técnicas para a análise dos ossos: a micro fluorescência de raios-X ( $\mu$  - XRF) e a emissão de radiação gama induzida por protões (PIGE).

A técnica  $\mu$  - XRF é um método analítico que nos últimos 15 anos tem alcançado muito

interesse. Oferece a possibilidade de uma análise elemental com sensibilidade posicional de amostras não homogêneas. Com a disponibilidade da ótica de raios-X, que permite focar ou concentrar o feixe numa pequena área da amostra, e de uma fonte de raios-X com alto brilho, é possível obter a intensidade de fluorescência suficiente a partir da área da amostra [4]. Esta técnica será utilizada para a quantificação de elementos como o Al, P, K, Ca, Fe, Zn, Sr, Cu e Pb.

A técnica de PIGE faz parte das técnicas de feixe de iões (IBA- *Ion Beam Analysis*) que permitem o estudo da composição de diferentes tipos de amostras através do bombardeamento por um feixe de partículas carregadas de um alvo desconhecido e do estudo das reações nucleares observadas e conhecidas. Esta técnica tornou-se na última década uma referência e é utilizada para a medição de elementos leves em amostras espessas, finas ou intermédias. Na análise de amostras espessas procede-se à integração da secção eficaz da reação em estudo ao longo da profundidade da amostra [5]. Através desta técnica será possível a análise qualitativa e quantitativa de elementos como F, Na, Mg.

A presente dissertação divide-se em 8 capítulos. O Capítulo 1, a Introdução, introduz os aspetos gerais acerca da DC, os objetivos da dissertação bem como as técnicas que serão utilizadas para alcançar tais objetivos. O Capítulo 2, Estruturas Ósseas do Cotovelo, descreve de uma forma sucinta os ossos e todos os constituintes que compõem a articulação do cotovelo. No Capítulo 3, Displasia do Cotovelo, estão explicadas as 4 condições da DC e o estado da arte referente ao estudo da doença. No Capítulo 4, Espectroscopia de Raios-X, estão descritos os princípios físicos associados à  $\mu$  - XRF, bem como os componentes e procedimentos que fazem parte da técnica. O Capítulo 5, Emissão de Radiação Gamma Induzida por Protões, descreve a técnica de PIGE e os seus formalismos. O Capítulo 6, Procedimento Experimental, descreve os métodos e procedimentos adotados para a realização do trabalho. O Capítulo 7, Resultados e Discussão, apresenta os resultados e discussão acerca deles. Por fim, o Capítulo 8, Conclusões e Perspetivas, apresenta as conclusões obtidas com o presente trabalho, bem como a perspetiva de trabalhos futuros neste área.

## Capítulo 2

# Estruturas Ósseas do Cotovelo

A articulação do cotovelo é considerada uma articulação composta uma vez que é constituída pelas articulações úmero-radial, úmero-ulnar e radio-ulnar [6]. Os movimentos de flexão e extensão do úmero relativamente ao rádio e cúbito<sup>1</sup> são possíveis devido à existência dessas articulações [7]. Já os movimentos de pronação e supinação devem-se à superfície côncava formada pelo osso do cúbito articulado com a cabeça do rádio [2].

A Figura 2.1 representa o a articulação do cotovelo canino, onde são visíveis os três ossos que a constituem: úmero distal (A) e rádio (B) e cúbito (C) proximais.

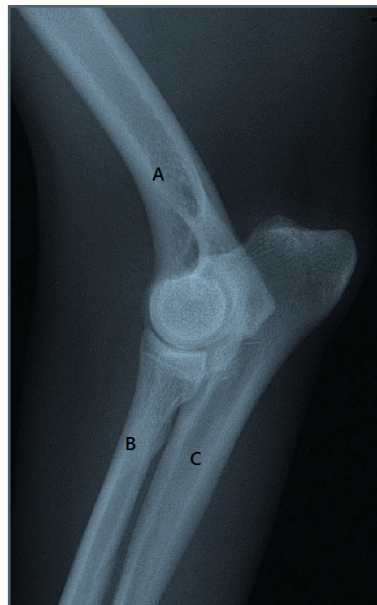


Figura 2.1: Projeção mediolateral da extensão do cotovelo. (A) Úmero; (B) Rádio; (C) Cúbito (Adaptado da Ref. [8]).

---

<sup>1</sup>Chama-se atenção que cúbito e ulna são nomes diferentes dados ao mesmo osso.

## 2.1 Úmero

O úmero é um osso longo dividido pelos segmentos epífise proximal, diáfise e epífise distal. Tendo em conta a articulação do cotovelo, apenas se considerará a extremidade distal do úmero. Esta é constituída pelo côndilo que, por sua vez apresenta uma superfície pequena e lateral, o capitulum, para articulação com a cabeça do rádio, e uma outra superfície maior e localizada medialmente, a tróclea, para articulação com a incisura troclear da ulna [9] .

Na região caudal do côndilo apresenta-se a fossa olecraniana (ver Figura 2.2) caracterizada por uma profunda escavação. Durante a extensão do cotovelo, o processo ancóneo da ulna projeta-se para o interior da fossa olecraniana do úmero, sendo assegurada a estabilidade lateral e rotacional da articulação. Por outro lado, na superfície cranial do côndilo encontra-se a fossa radial (ver Figura 2.2), também denominada por fossa coronoide. No cão, as fossas olecraniana e coronoide comunicam entre si através do orifício supratroclear [9] .

O epicôndilo lateral é uma saliência lateral no côndilo do úmero que se encontra numa posição caudal proximal em relação ao capitulum (ver figura 2.2) e que dá origem aos músculos extensores do carpo e dos dedos. O epicôndilo medial é uma proeminência no lado medial do côndilo, proximal à superfície articular da tróclea (ver Figura 2.2). É maior que o epicôndilo lateral e dá origem aos músculos flexores do carpo e dos dedos [9] .

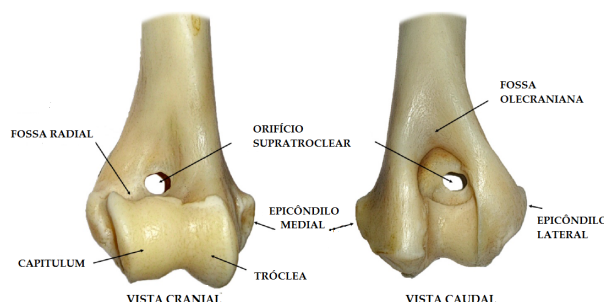


Figura 2.2: Representação das diferentes estruturas ósseas que constituem o côndilo do úmero distal (Adaptado da Ref. [7]).

## 2.2 Rádio

O rádio é o osso que apresenta o principal contributo no suporte do peso do antebraço e está dividido em cabeça, pescoço, corpo e tróclea. Tendo em conta que o interesse do presente trabalho é a articulação do cotovelo, será descrita apenas a cabeça do rádio. Esta é constituída pela fôvea e circunferência articular (ver Figura 2.3). A fôvea está articulada com o capitulum e a parte lateral da tróclea do úmero e suporta praticamente todo o peso transmitido a partir do antebraço para o braço. Por outro lado a circunferência articular, situada na zona caudal do rádio, é uma superfície convexa e estreita para a articulação com a incisura radial da ulna, tornando possível a rotação do antebraço [9].

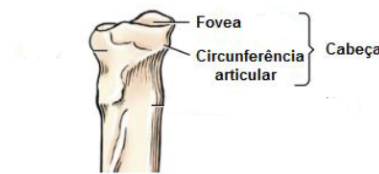


Figura 2.3: Representação do plano caudal da cabeça do rádio (Adaptado da Ref. [10]).

## 2.3 Cúbito

O cúbito e o rádio são os ossos constituintes do antebraço. O primeiro apresenta um comprimento superior ao segundo e encontra-se na região caudal do antebraço. A extremidade proximal do cúbito inclui o olécrano e as articulações do cúbito com o úmero e o rádio (ver Figura 2.4). O olécrano é constituído pelo tubérculo olécrano, processo ancóneo e a parte proximal da incisura troclear. É no tubérculo olécrano que se inserem os músculos extensores da articulação do cotovelo [9]. O processo ancóneo (PA) forma a extremidade proximal da incisura troclear do cúbito e, tal como mencionado anteriormente, encaixa-se na fossa olecraniana do úmero quando o cotovelo se encontra em extensão, restringindo o movimento lateral da articulação do cotovelo [11]. Na extremidade distal da incisura troclear encontram-se os processos coronoideis medial e lateral. Entre estes é formada uma incisura, a incisura radial, que se articula com a circunferência articular do rádio.

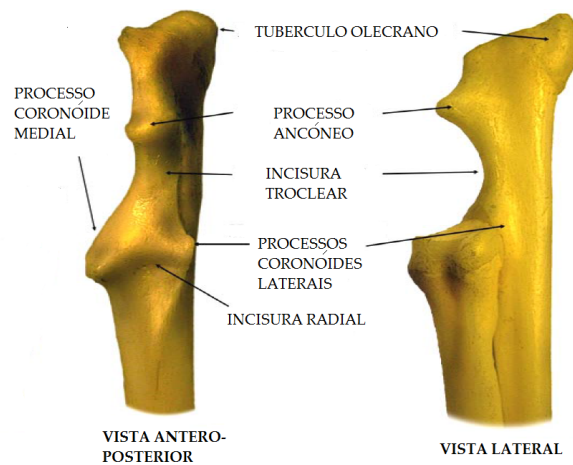


Figura 2.4: : Representação das diferentes estruturas do cúbito nas vistas antero-posterior e lateral (Adaptado da Ref. [7]).



## Capítulo 3

# Displasia do Cotovelo

A displasia do cotovelo é caracterizada por um desenvolvimento anormal da articulação do cotovelo que ocorre com frequência em cães de raças de médio e grande porte a partir dos 4 a 6 meses [12].

A condição ortopédica displásica é, habitualmente, manifestada por quatro patologias: (1) osteocondrite dissecante do côndilo umeral, (2) não união do processo ancóneo, (3) incongruência articular do cotovelo e (4) fragmentação do processo coronóide medial. Estas patologias podem manifestar-se de forma isolada ou combinada e dão origem à osteoartrose (processo de degradação articular) do cotovelo [1].

### 3.1 Osteocondrite Dissecante do Côndilo Umeral

A osteocondrite é caracterizada por uma insuficiência de ossificação endocondral, que resulta no aumento da espessura da cartilagem articular. Existem regiões específicas que são capazes de formar osso diretamente no tecido conjuntivo, sem usar um molde cartilaginoso, denominando-se esse processo de ossificação intramembranosa. Contrariamente, na ossificação endocondral, a cartilagem de crescimento é substituída por osso através de um processo sequencial de proliferação celular, síntese de uma matriz extracelular, hipertrofia celular, mineralização da matriz extracelular e invasão vascular. Este processo é vantajoso, uma vez que permite o crescimento e alongamento ósseo, através da adição contínua de cartilagem e consequente substituição por osso, de modo a que o animal seja capaz de suportar o seu peso [13].

A Osteocondrite Dissecante do Côndilo Umeral (ODCU) implica a existência de uma fissura concreta entre a região da cartilagem condensada e o osso subjacente. Isto leva a uma inflamação da articulação e, consequentemente dor. A doença é verificada mais comumente nas superfícies convexas de grandes articulações, como é o caso da tróclea do côndilo do úmero [14].

### 3.2 Não União do Processo Ancóneo

O processo ancóneo é unido ao cúbito através de tecido fibroso ou, por outro lado, pode ficar completamente separado deste, dando origem a instabilidade lateral do processo ancóneo. Assim sendo, NUPA define-se como a falta da fusão do processo ancóneo com a metáfise proximal do cúbito (ver Figura 3.1) em animais com vinte semanas de idade. Se nessas vinte semanas o processo ancóneo não se uniu com o cúbito, tal não acontecerá espontaneamente. A instabilidade criada tem como consequências a irritação, deterioração e degeneração secundária das superfícies articulares do cotovelo [15].

Há evidências de que uma das causas desta patologia é o desproporcional crescimento do rádio e cúbito. Se em termos de comprimento o rádio apresenta um maior crescimento que o cúbito, a cabeça do rádio exercerá diretamente pressão sobre a tróclea do úmero. Esta pressão é transferida da tróclea do úmero para o processo ancóneo provocando distorção no processo ancóneo e consequente enfraquecimento da união óssea [15].



Figura 3.1: Representação da NUPA. A seta branca indica o local da falha na união do processo ancóneo com o cúbito (Adaptado da Ref. [16]).

### 3.3 Incongruência Articular do Cotovelo

A Incongruência Articular do Cotovelo é caracterizada pela situação do não alinhamento da superfície articular da tróclea do úmero com as superfícies articulares do cúbito e do rádio, ou seja, as superfícies não são paralelas apresentando um mau alinhamento. A sua manifestação pode dever-se a: (1) comprimento curto do cúbito em relação ao rádio; (2) comprimento do rádio relativamente curto e (3) a uma forma oval da incisura troclear.

A IAC tem como consequência a osteoartrose, uma vez que uma área menor que o suposto



está a suportar o peso do corpo e, consequentemente, sob uma alta pressão [17].

### 3.4 Fragmentação do Processo Coronoide

A fragmentação do processo coronoide medial é a lesão mais comum da displasia do cotovelo e é sobre esta patologia que o presente trabalho incide. Antes dos cinco meses de idade o processo coronoide dos cães consiste em cartilagem que lentamente ossifica da base até à extremidade. Devido a um defeito na ossificação da cartilagem, ocorre condromalacia<sup>1</sup>, o que causa fissura e fragmentação da cartilagem e do osso subjacente [18].

A incongruência entre o rádio e o cúbito leva a um aumento na pressão sobre o processo coronoide medial em desenvolvimento, provocando microfraturas e fragmentação do processo coronoide medial (ver Figura 3.2). Em cães de raça pequena o processo de ossificação termina mais rapidamente do que em cães de raça grande. Este facto pode explicar o porquê da FPCM ocorrer mais frequentemente em cães de raça grande do que em cães de raça pequena [18].

Apesar da grande quantidade de literatura que tenta descrever o suposto processo de formação desta patologia, a verdadeira patogénese (forma como a doença se inicia e/ou desenvolve) permanece pouco definida [19]. A maioria das diferentes hipóteses para a patogénese da FPCM envolve ossificação ou forças mecânicas anormais [2]. Ou seja, acredita-se que a fratura esteja associada a influências genéticas, ambientais, nutricionais e mecânicas [17].

Alguns estudos sugerem uma componente genética na patogénese à qual poderá ser associado um efeito ambiental que poderá dar origem à inflamação e consequente fratura. Na secção seguinte serão aprofundadas estas hipóteses.

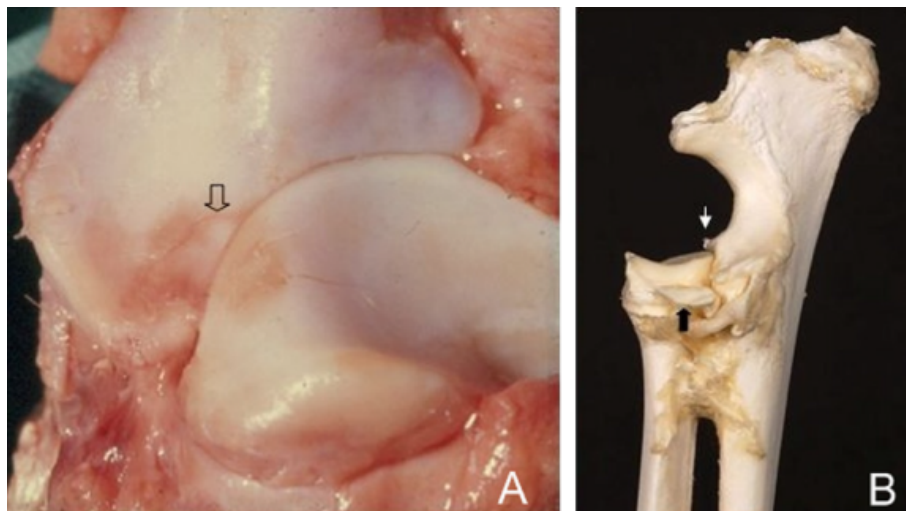


Figura 3.2: Representação da FPCM. (A) Fragmentação do processo coronoide medial (seta) na região lateral do processo coronoide, causada supostamente por forças de cisalhamento entre o cúbito e o rádio. (B) Fratura na posição apical (seta preta) no processo coronoide medial, alegadamente motivada pelo facto do rádio apresentar um comprimento curto relativamente ao cúbito (seta branca) (Adaptado da Ref. [2]).

<sup>1</sup>Patologia crónica degenerativa da cartilagem.

### 3.5 Estado da Arte

Qualquer uma das diferentes formas de DC conduzirá à OA com consequências possivelmente graves para o bem estar do animal e, conseqüentemente, do respetivo proprietário. Assim sendo, vários grupos de pesquisa têm-se aplicado neste tema de forma a procurar uma maior elucidação da etiologia da DC [12]. Deste modo, de seguida são descritos estudos feitos nesse sentido, bem como os resultados obtidos.

Como já foi referido anteriormente, a FPCM é a principal doença associada à displasia do cotovelo. É frequentemente diagnosticada em cães de raças de médio e grande porte (ver Tabela 3.1). O estudo de J.Temwichitr *et al* [2] pretendia investigar as hipóteses da patogénese da doença e os genes causadores mas, embora a FPCM seja considerada uma condição hereditária, o/os genes responsáveis por tal condição, ainda não foram identificados.

Tabela 3.1: Representação do ranking da OFA (Orthopedics Foundation for Animal) relativo à incidência da displasia do cotovelo em diferentes raças (adaptado da Ref. [2]).

Ranking	Raça	Percentagem da incidência da Displasia do Cotovelo
1	Chow Chow	46,6
2	Rottweiler	40,8
3	Bernese Mountain	29,1
6	Newfoundland	24,7
7	Fila Brasileiro	23,5
8	German Shepherd	19,4
9	Dogue De Bordeaux	19,3
10	American Bulldog	18,6
11	St. Bernard	18,5
13	Staffordshire Bull Terrier	15,7
14	Bloodhound	15,7
19	English Springer Spaniel	13,5
20	Shiloh Shepherd	13,0
23	Iris Wolf Hound	11,9
24	Greater Swiss Mountain	11,6
26	Golden Retriever	11,4
27	Labrador Retriever	11,2

A existência de doenças relacionadas com determinado tipo de raça sugere a presença de uma causa genética. Existe uma predominância da FPCM, e conseqüentemente da displasia do cotovelo, em cães do sexo masculino que se julga estar relacionada com o peso dos animais. No estudo de J.Temwichitr *et al* dos 570 machos e 585 fêmeas (de raça Labrador, Golden Retriever e a mistura de ambos) criados como cães-guia de pessoas cegas na Holanda, 14.7% padeciam de FPCM, sendo os machos afetados 1.6 vezes mais frequentemente do que as fêmeas. Neste estudo verificou-se, ainda, que a radiografia por si só não é suficientemente precisa para a deteção da patologia em todos os casos [2].

O estudo de I.C.M. Lavrijsen *et al* [20] utilizou quatro radiografias por cada cotovelo na ava-

liação de 2693 Labrador Retriever (LR), 1213 Golden Retrievers (GR) e 974 Bernese Mountain Dogs (BMD) para a detecção da displasia do cotovelo, entre 2002 e 2009, na Holanda. A DC diagnosticada nos LRs, GRs e BMDs foi 6%, 5% e 15%, respetivamente. A FPCM foi a patologia mais diagnosticada, por vezes acompanhada de ODCU no LR e GR, e por IAC em BMD. A esclerose<sup>1</sup> na base do processo coronoide medial foi o sinal radiográfico mais correlacionado com a FPCM nas três raças. As estimativas de herdabilidade da FPCM nos GR foi alta o suficiente para se ponderar que se os cães afetados deixarem de reproduzir, poderá existir um progresso genético e, deste modo, conhecer o fenótipo de doentes parece ser fundamental para qualquer tipo de estudo genético.

S.F. Lau *et al* [21] receberam aprovação para realizar um estudo com 14 Labrador Retriever em crescimento, 7 com idade de 6 semanas e 7 com idade de 7 semanas. A cada 14 dias foram realizadas radiografias e tomografias computadorizadas (TC), mas o diagnóstico definitivo das doenças do coronoide medial foi baseado em necropsia e micro tomografia computadorizada. A frequência de FPCM nos cães estudados foi de 50%. A tomografia computadorizada apresentou uma taxa de detecção precoce da FPCM de 30,8% enquanto que através da radiografia essa detecção precoce não foi possível, sendo os primeiros sinais observados às 14 semanas de idade. A combinação da necropsia e tomografia micro computadorizada permitiu mostrar que a FPCM é manifestada apenas pela lesão do osso subcondral em cães com idade inferior a 18 semanas de idade. Assim sendo, neste estudo foi demonstrado que a FPCM pode ser detetada por TC em cães jovens, com 14 semanas de idade, e que a lesão muito provavelmente tem origem na base do processo coronoide medial. Logo, a TC deve ser usada quando se investiga doenças articulares do cotovelo.

O objetivo do estudo de I.C. Mariee *et al* [1] era a avaliação do osso displástico e da cartilagem de cães que foram submetidos a coronoidectomia subtotal (extração de parte do coronoide) através de artroscopia unilateral e bilateral para o tratamento da DC. Foram avaliadas 45 fatias de amostras de osso e cartilagem que foram fixadas em formol. O resultado mais comum foi a fragmentação do osso subcondral mais mole da parte central do processo coronoide. Em cães sem fragmentação óbvia, a DC foi caracterizada pelo amolecimento dos ossos e condromalacia (degeneração crónica da cartilagem). Quanto aos resultados histopatológicos (resultados de como determinada doença afeta um tecido, ou seja, um conjunto de células) consistiram principalmente em osteonecrose do osso subcondral com necrose no interior dos espaços da medula. Na cartilagem articular verificou-se a formação de clones de condrócitos e necrose da cartilagem focal. A patologia da DC foi encontrada principalmente no osso subcondral e não na cartilagem articular. A vascularização pode apresentar um papel na patogénese da osteonecrose.

O tratamento da fragmentação do processo coronoide medial pode ser conservador ou cirúrgico. Um tratamento conservador consiste num controlo do peso e num plano de exercício regular, com ou sem medicamentos anti-inflamatórios e sistemáticos. O tratamento cirúrgico, principalmente a artroscopia, consiste na remoção de fragmentos ósseos e cartilaginosos afetados. A artroscopia é uma técnica cirúrgica minimamente invasiva, com baixa taxa de lesões dos tecidos moles periarticulares e estruturas intra-articulares. Deste modo leva a uma redução na dor, nas infeções pós-operatório e a uma rápida recuperação da função articular. Permite uma boa visibilidade da articulação e quando realizada com uma equipa experiente os riscos de complicação são reduzidos [22].

O estudo de Neil J. Burton *et al* [19] apresentava como objetivo quantificar a densidade mineral óssea (DMO) no processo coronoide medial (PCM) de cães com e sem fragmentação do processo

---

<sup>1</sup>Condição em que a densidade óssea aumenta.

coronóide medial usando absorciometria de raios-X de dupla energia. Verificou-se que a DMO nas amostras de controlo (amostras referentes a cães sem FPCM) e amostras correspondentes a cães com FPCM, tanto nas orientações proximodistal como mediolateral, apresenta uma diferença significativa. Nas amostras que apresentavam a patologia em causa a densidade de todo o processo coronoide era menor que nas amostras de controlo. Por outro lado, verificou-se em todas as amostras que na região abaxial do processo coronoide medial a densidade média óssea apresentava uma elevação de 50% relativamente ao centro axial. Estas diferenças podem influenciar a resistência à compressão por parte do PCM e, desse modo, surgir a predisposição para a falha osteocondral na região cranioaxial do PCM em cães.

A DC apresenta uma etiologia multifatorial, podendo ocorrer devido a má formação óssea, doenças genéticas, influências nutricionais e mecânicas. Com base nas estimativas de herdabilidade publicadas na literatura veterinária, o meio ambiente pode apresentar influência na expressão do genótipo. Por outro lado, a ingestão de cálcio e vitamina D pode causar perturbações na ossificação endocondral e, conseqüentemente, levar à ocorrência da NUPA, FPCM, ODCU e IAC. Assim sendo, dietas desequilibradas ou excessivas em determinados alimentos, nomeadamente minerais, devem ser evitadas. Contudo, quando o animal não está numa situação de risco genético, este fator ambiental (a alimentação) não desempenhará um papel significativo na ocorrência de DC [12].

Verifica-se que os estudos referenciados focam-se na parte mecânica do processo que poderá originar a fratura. No presente trabalho investigar-se-á pela primeira vez a possibilidade de um processo de desmineralização ou concentração anormal de elementos traço. Serão considerados, portanto, fatores ambientais, nomeadamente a intoxicação por metais pesados ou, por outro lado, uma variação anormal da razão entre o cálcio e o fósforo que poderão contribuir ou não para o aparecimento da lesão. Isto quer dizer que atualmente são conhecidos os mecanismos de fratura, mas nada se sabe acerca da causa da inflamação inicial presente no osso, especialmente em cães que não apresentem estruturas ósseas deficientes.

## Capítulo 4

# Espectroscopia de Raios-X

### 4.1 Raios-X

#### 4.1.1 Descoberta dos Raios-X

Os raios-X foram descobertos por Röntgen em 1895 durante os seus estudos sobre os fenómenos de descargas elétricas. Através de um tubo de raios catódicos com uma elevada voltagem, Röntgen observou que sais de bário tornavam-se fluorescentes quando colocados perto do tubo, embora nada visível fosse emitido pelo tubo. Tal efeito persistia mesmo quando o tubo era envolvido por papel preto. Röntgen verificou então que os raios responsáveis por este fenómeno eram provenientes das paredes do tubo e, devido ao fato de não conhecer a sua origem denominou-os de raios-X [23].

Os raios-X são radiação eletromagnética de origem semelhante à radiação visível contudo, apresentam um comprimento de onda com algumas ordens de grandeza inferior [23], entre os 0,005 e 10 nm [24], e tal como as radiações ultravioleta, visível e infravermelha, exibem duas naturezas distintas, apresentando em determinadas situações um comportamento ondulatório e noutras corpuscular [25].

#### 4.1.2 Produção dos Raios-X

Os raios-X são produzidos quando eletrões, ou outras partículas com energia suficiente, colidem com a matéria [25], resultando da desaceleração desses mesmo eletrões e/ou em transições eletrónicas nas orbitais interiores dos átomos [26]. Os raios-X podem ainda ser obtidos através de um outro fenómeno que consiste no decaimento de fontes radioativas [27].

Quando as partículas de alta energia que colidem com a matéria são desaceleradas, é emitida radiação com uma ampla banda de comprimentos de onda que resulta num espectro contínuo [28]. Esta radiação é denominada por radiação branca ou radiação de Bremsstrahlung como é observado na Figura 4.1 .

Por outro lado, quando uma partícula de alta energia atinge um eletrão atómico ligado e a energia dessa partícula é superior à energia de ligação do eletrão, o eletrão é ejetado da sua camada originando uma lacuna. Enquanto essa lacuna não for preenchida o átomo encontra-se num estado instável, podendo regressar ao seu estado normal através de dois processos distintos. Um desses

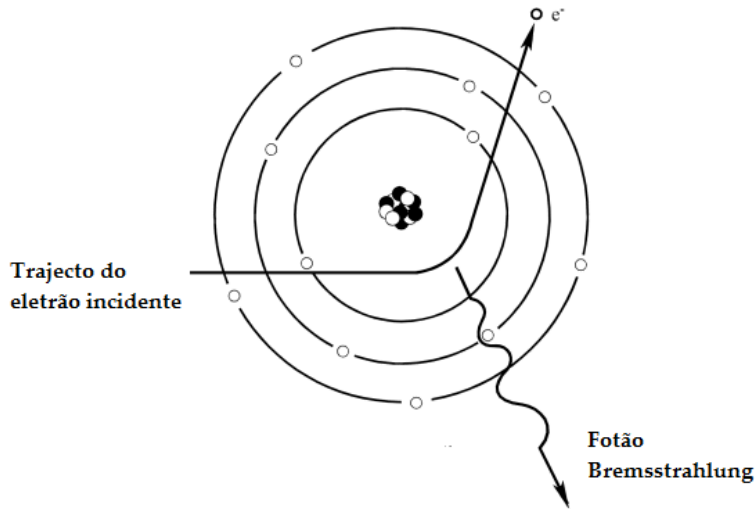


Figura 4.1: Desaceleração do electrão incidente através da emissão de radiação de Bremsstrahlung (Adaptado da Ref. [29]).

processos é conhecido como o efeito de Auger e não consiste na emissão de fótons de raios-X, daí ser um processo não radiativo, mas sim de outros eletrões do átomo denominados por eletrões Auger [28]. Neste caso, a radiação incidente é absorvida, por exemplo, por um eletrão da camada K que abandona o átomo. De seguida, um eletrão transita para essa mesma camada, sendo essa transição acompanhada pela ejeção de um eletrão de uma camada eletrónica mais externa, resultando numa ionização dupla do átomo através do eletrão Auger [30] (ver Figura 4.2.b). A probabilidade deste efeito aumenta com a diminuição da diferença dos estados energéticos correspondentes e, é também maior para elementos de baixo  $Z$  [24]. O segundo processo pelo qual o átomo recupera a estabilidade consiste na transferência de um eletrão das orbitais externas para preencher a lacuna da camada interna, ocorrendo a emissão de um fóton de raios-X de energia igual à diferença de energia entre os estados inicial e final do eletrão transferido [28] (ver Figura 4.2.c).

Todos os fótons de raios-X emitidos apresentam energias que correspondem à diferença dos estados energéticos dos eletrões atômicos e, assim sendo cada elemento apresenta um espectro descontínuo característico [28]. A relação entre o comprimento de onda de uma linha característica de raios-X e o  $Z$  do elemento correspondente é dada pela lei de Moseley [24]:

$$\frac{1}{\lambda} = k(Z - b)^2 \quad (4.1)$$

sendo  $k$  uma constante que apresenta valores diferentes para cada série espectral,  $b$  a constante de blindagem que está relacionada com o efeito de repulsão entre os eletrões [24] e tem um valor pouco inferior à unidade e  $\lambda$  o comprimento de onda do fóton de raios-X, em Å, que é inversamente proporcional à  $E$ , em keV, de acordo com a seguinte relação [28]:

$$\lambda = \frac{12.4}{E} \quad (4.2)$$

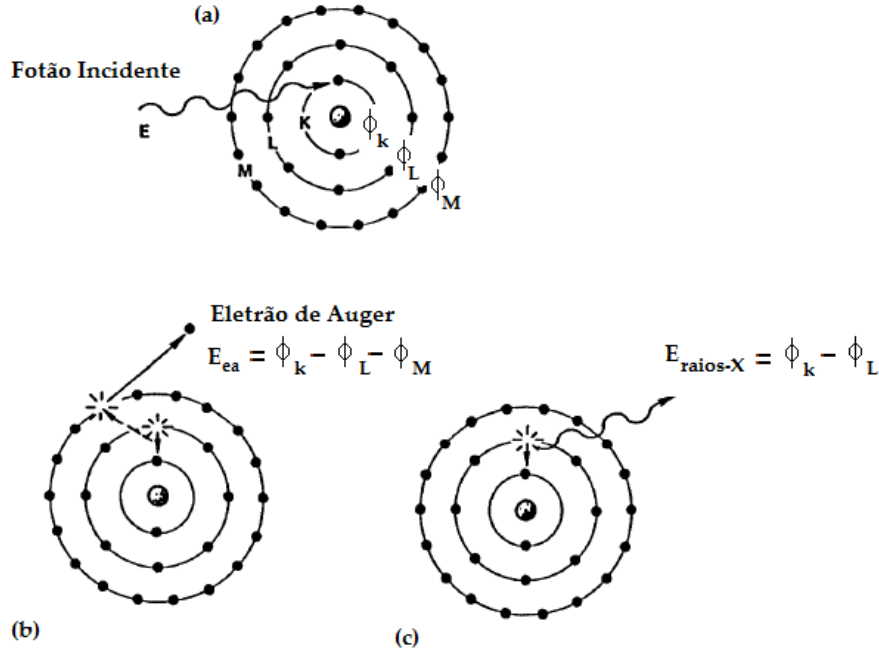


Figura 4.2: Ilustração da emissão de raio-X e do elétron Auger. (a) Representação dos vários níveis de energia do átomo ( $\Phi_K$ ,  $\Phi_L$ ,  $\Phi_M$ ) e do fóton incidente de energia  $E$ ; (b) a transição de um elétron do nível L para a lacuna da camada K é acompanhada da emissão do elétron Auger de energia  $E_{ea}$  (c) um elétron do nível L é transferido para a lacuna da camada K sendo produzido um fóton de raios-X de energia  $E_{raios-X}$ ; (Adaptado da Ref. [30]).

Os raios-X surgem ainda devido a processos de decaimento radioativo. As reações nucleares envolvem a captura de elétrons K (mais comum que elétrons L ou M) pelo núcleo e a formação de um elemento com  $Z$  inferior. Devido a esta captura K, ocorrem transições eletrônicas e é observado o espectro de linhas de raios-X do elemento recentemente formado [27].

No presente trabalho, visto que trabalharemos com um tubo de raios-X de baixa potência, este último processo de produção de raios-X não será considerado.

## 4.2 Interação dos Raios-X com a Matéria

### 4.2.1 Absorção

Quando um feixe de fótons de raios-X com comprimento de onda  $\lambda$  e de intensidade  $I_0$  incide sobre uma amostra, a fração de feixe que atravessa essa mesma amostra é dada pela Lei de Lambert-Beer [28]:

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \exp(\mu(\lambda)\rho x) \quad (4.3)$$

onde  $\mu$  ( $cm^{-1}$ ) representa o coeficiente de atenuação linear,  $\frac{\mu}{\rho}$  ( $cm^2.g^{-1}$ ) o coeficiente de atenuação mássico do material constituinte da amostra de densidade  $\rho$  ( $g.cm^{-3}$ ) e espessura  $x$  (cm). Através da

equação (4.3) é perceptível que à diferença  $I_0 - I$  corresponde o número de fótons perdidos no processo de absorção [28]. Os raios-X são atenuados devido à interação dos seus fótons com os elétrons externos e internos, ou mesmo com o próprio núcleo dos átomos [31].

O valor do coeficiente de atenuação mássico dos raios-X na equação (4.3) é uma função tanto da absorção fotoelétrica,  $\tau$ , como da dispersão,  $\sigma$  [30]:

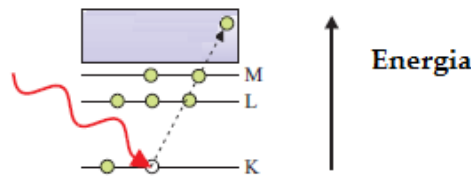
$$\frac{\mu}{\rho} = f(\tau) + f(\sigma) \quad (4.4)$$

contando o termo da dispersão com a contribuição da dispersão coerente e incoerente. No entanto, geralmente  $\tau$  é superior a  $\sigma$  assumindo-se que [30]:

$$\frac{\mu}{\rho} = f(\tau) \quad (4.5)$$

e por esta razão, os coeficientes de atenuação mássicos são muitas vezes referidos como coeficientes de absorção mássicos. Deste modo, a componente principal de absorção de raios-X é causada pelo efeito fotoelétrico através do qual um elétron das camadas internas de um átomo é ejetado por um fóton com energia suficiente (ver Figura 4.3.a). O fóton primário, isto é, o fóton incidente é completamente aniquilado quando um fóton secundário com menor energia é emitido imediatamente após o rearranjo dos elétrons. Esta emissão do fóton secundário é denominada por fluorescência de raios-X (ver Figura 4.3.b) [31].

**(a) Absorção fotoelétrica**



**(b) Fluorescência de raios-X**

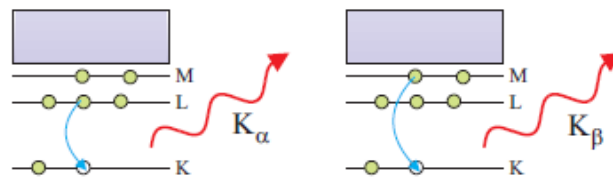


Figura 4.3: Representação da absorção fotoelétrica e fluorescência de raios-X. (a) Um fóton de raio-X é absorvido e um elétron é ejetado do átomo, formando-se uma lacuna na camada interior; (b) Um dos elétrons de uma das camadas mais externas preenche a lacuna, sendo emitido um fóton. Neste exemplo o elétron provém da camada L, sendo esta transição uma das que origina radiação de fluorescência denominada como linha  $K_\alpha$ , ou, por outro lado o elétron pode ter origem na camada M, e neste caso esta transição é uma das possíveis que origina radiação de fluorescência  $K_\beta$  (Adaptado da Ref. [32]).

A absorção fotoelétrica ocorre para todos os níveis de energia do átomo, por isso a total absorção fotoelétrica é determinada pela soma de cada uma das absorções possíveis a partir das várias



camadas atômicas K, L, M, N, O e P, o que numericamente corresponde a um coeficiente de absorção mássico específico [31]:

$$\left(\frac{\tau}{\rho}\right) = \left(\frac{\tau}{\rho}\right)_K + \left(\frac{\tau}{\rho}\right)_L + \left(\frac{\tau}{\rho}\right)_M + \left(\frac{\tau}{\rho}\right)_N + \left(\frac{\tau}{\rho}\right)_O + \left(\frac{\tau}{\rho}\right)_P \quad (4.6)$$

Cada uma das absorções representadas pelos diferentes membros da equação 4.6 podem ainda ser divididas de acordo com as subcamadas correspondentes. Assim sendo, todos os coeficientes individuais de absorção mássicos seguem, aproximadamente, a Lei de Bragg-Pierce [31]:

$$\left(\frac{\tau}{\rho}\right)_j = \frac{k_j Z^3}{E^{\frac{8}{3}}} \quad (4.7)$$

com diferentes valores de energia  $E$  e de constantes  $k_j$  para as respectivas subcamadas ou níveis  $j$ . Na figura 4.4 está representado o gráfico do coeficiente de absorção mássico do Molibdénio em função da energia do fóton, onde se observa que o coeficiente de absorção mássico diminui quando a energia aumenta embora, nas descontinuidades de absorção para cada camada, se verifiquem saltos abruptos do  $\left(\frac{\tau}{\rho}\right)$ . Tal acontece porque há um número maior de eletrões da próxima camada que podem ser expelidos. As energia nesses saltos abruptos do  $\left(\frac{\tau}{\rho}\right)$  correspondem às energias de ligação ou ionização dos eletrões nas respectivas camadas ou subcamadas [31].

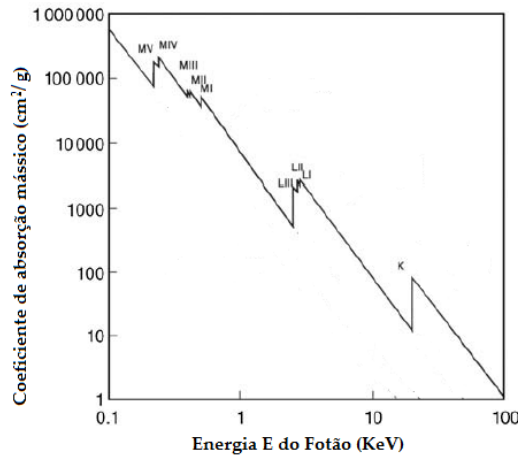


Figura 4.4: Coeficiente de absorção mássico para o Molibdénio em função da energia  $E$  do fóton (Adaptado da Ref. [31]).

### 4.2.2 Dispersão

A dispersão é outro tipo de interação entre os raios-X e a amostra [4]. Quando esta interação é elástica, ou seja, nenhuma energia é perdida no processo de colisão, diz-se que a dispersão é coerente ou, por outro lado, é referida como dispersão de Rayleigh. Neste caso, uma vez que nenhuma alteração de energia está envolvida, a radiação dispersa de forma coerente apresenta o mesmo comprimento de onda que a radiação incidente [28] bem como uma relação de fase fixa com a mesma. A dispersão de Rayleigh ocorre principalmente para baixas energias e materiais com elevado  $Z$  [24].

Por outro lado, quando um fóton de raios-X interage com um elétron fracamente ligado numa orbita externa do átomo, pode ocorrer perda de energia. Neste caso, a dispersão é referida como incoerente ou então por dispersão de Compton e o comprimento de onda dos fótons dispersos incoerentemente será maior que o comprimento de onda dos fótons dispersos coerentemente. A dispersão de Compton é, portanto, uma colisão inelástica entre um fóton e um elétron [30]. Parte da energia do fóton incidente é absorvida pelo elétron de recuo, enquanto que o fóton é deflectido com perda de energia ou o correspondente aumento de comprimento de onda, tal como referido anteriormente [26] (ver Figura 4.4) . O fóton deflectido não perde só energia em relação ao fóton incidente, mas também qualquer relação de fase [30].

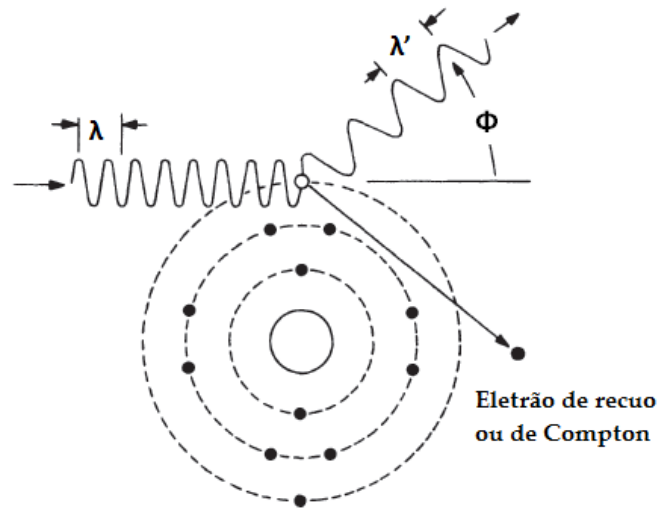


Figura 4.5: Dispersão de Compton. O fóton incidente que apresenta o comprimento de onda,  $\lambda$ , colide com um elétron da orbital externa. O fóton incidente sofre um desvio de  $\phi$  e passa a apresentar o comprimento de onda,  $\lambda'$ , enquanto o elétron é ionizado (Adaptado da Ref. [26]).

A soma das energias do fóton disperso e do elétron de recuo é igual à energia do fóton incidente, tal como previsto pelas leis de conservação da energia. A variação do comprimento de onda do fóton é dada por [26]:

$$\lambda' - \lambda = \Delta\lambda = \left(\frac{h}{m_e c}\right)(1 - \cos(\phi)) \quad (4.8)$$

onde  $\lambda'$  e  $\lambda$  são o comprimento de onda, em  $cm$ , do fóton disperso e do fóton incidente, respetivamente;  $h$  é a constante de Planck ( $4,14 \times 10^{-5} \text{ eV.s}$ );  $m_e$  corresponde à massa do elétron ( $9,11 \times 10^{-28} \text{ g}$ );  $c$  é a velocidade da luz ( $3,00 \times 10^{10} \text{ cm.s}^{-1}$ ) e  $\phi$  é o ângulo entre o fóton incidente e o fóton disperso.

Para a análise de energia dispersiva, é mais conveniente a equação do efeito de Compton ser aplicada da seguinte forma [26]:

$$E' = \frac{E}{1 + \left(\frac{E}{m_e c^2}\right)(1 - \cos(\phi))} \quad (4.9)$$

onde  $E'$  e  $E$  correspondem à energia, em  $keV$ , do fóton disperso e incidente, respetivamente. Substi-

tuindo os valores na equação 4.9 obtém-se [26]:

$$E' = \frac{E}{1 + (0,001957E)(1 - \cos(\phi))} \quad (4.10)$$

A dispersão de Compton diminui se a energia dos fótons diminui ou se o número atômico do material aumenta [31].

### 4.3 Micro - Fluorescência de Raios-X ( $\mu - XRF$ )

O potencial do uso dos raios-X na análise qualitativa e quantitativa de diferentes amostras tem sido bastante apreciado desde a sua descoberta. Desde então, uma grande variedade de técnicas instrumentais, que têm como base o uso dos raios-X, têm sido desenvolvidas. Entre essas técnicas, a espectroscopia de fluorescência de raios-X (XRF) é a mais utilizada uma vez que permite uma análise multi-elemental, não destrutiva e com alta sensibilidade numa vasta gama de diferentes tipos de amostras (sólidos, líquidos e gases) [33].

Neste método, a amostra é irradiada por um feixe de raios-X criado num tubo de raios-X ou uma fonte radioactiva [34]. O feixe de raios-X vai interagir com os átomos da amostra através de três processos, o efeito fotoelétrico, a dispersão de Compton (incoerente) e a dispersão de Rayleigh (coerente) [35], descritos na secção 4.2. Assim sendo, os elementos presentes na amostra são excitados por absorção do feixe primário e emitem as suas próprias riscas características de fluorescência de raios-X e, por esta razão esta técnica é apropriadamente denominada de fluorescência de raios-X [34].

XRF permite uma análise qualitativa, uma vez que cada linha de raios-X é característica de cada elemento, e uma análise quantitativa sendo que o número de raios-X registado é proporcional à concentração do elemento emissor da radiação. É bastante abrangente, com excepção dos elementos mais leves, elementos que apresentam  $Z < 12$ , devido ao seu baixo rendimento de fluorescência [36].

A maioria dos materiais não são homogêneos, sendo esta não homogeneidade que define as propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou outras da amostra. A espectroscopia de  $\mu - XRF$  oferece a possibilidade de uma análise elemental de material não homogêneo, através de um sistema óptico de raios-X que permite focar ou concentrar o feixe em pequenas áreas da amostra [4].

A radiação de fluorescência emitida pelos átomos após serem excitados pode ser medida através de dois métodos diferentes de espectroscopia, nomeadamente a espectroscopia dispersiva em energia ou espectroscopia dispersiva em comprimento de onda. Em  $\mu - XRF$  é principalmente a espectroscopia dispersiva em energia que se utiliza porque permite a captação de um grande ângulo sólido de radiação proveniente da amostra e não precisa de uma intensidade de excitação extremamente alta [4].

#### 4.3.1 Tubo de Raios-X

Neste trabalho a produção de raios-X é conseguida através de um tubo de raios-X. No tubo está montado um cátodo, um filamento de tungsténio (W), e um alvo de material metálico que funciona como ânodo. Normalmente, os alvos podem ser de tungsténio, crómio, cobre, molibdénio, ródio, escândio, ferro, cobalto, ouro e prata [34]. No tubo do equipamento utilizado neste trabalho o ânodo é de ródio.

No tubo de raios-X são gerados elétrons livres através do aquecimento do filamento. Estes elétrons são acelerados por alta tensão em direção ao ânodo e são parados através de processos de dispersão e absorção pelos átomos do material do ânodo, gerando radiação eletromagnética altamente energética, ou seja, raios-X. No entanto, tal como é explicado na secção 4.1.2, há dois tipos diferentes de radiação: radiação de bremsstrahlung e radiação característica do material do ânodo. Ambas as radiações provocam a excitação da amostra e a consequente emissão de radiação de fluorescência [4].

São utilizados circuitos separados para aquecer o filamento e para acelerar os elétrons em direção ao alvo (ver Figura 4.6). Enquanto o circuito de aquecimento (baixa tensão) proporciona os meios de controlo da intensidade dos raios-X, o circuito de aceleração (alta tensão) determina a energia dos raios-X [34].

A potência do tubo atinge poucos Watts, uma vez que apenas 1% da potência elétrica do tubo é convertida em radiação, sendo a restante dissipada sob a forma de calor. Por essa razão há a necessidade de sistemas de arrefecimento no ânodo, embora nos equipamentos mais modernos, esse arrefecimento seja desnecessário, pois os tubos são utilizados com uma menor potência devido a uma maior sensibilidade dos transdutores de raios-X [34]. O tubo utilizado neste estudo apresenta um sistema de arrefecimento através de ar.

O tubo pode ter duas direções de saída da radiação: tubo com janela lateral ou tubo com janela no fim do tubo. O tubo de raios-X utilizado neste trabalho apresenta uma janela lateral de Be (ver Figura 4.6). Neste caso, os elétrons atingem o alvo com um ângulo diferente de  $90^\circ$ . A distância entre o alvo e a janela tem de ser relativamente grande ao ponto de evitar o aquecimento da estreita janela. Este facto limita o ângulo sólido de radiação que pode ser capturado a partir do tubo. No entanto, os elétrons no tubo podem ser focados, o que permite a concentração dos elétrons numa pequena área que origina uma fonte de radiação com elevado brilho [4].

O tubo de raios-X necessita ainda de vácuo e um sistema de isolamento suficiente para a alta tensão e com proteção da radiação. Por isso, os tubos são fabricados com uma estrutura de vidro que é revestida num invólucro metálico. Este, por sua vez, é preenchido com óleo (ver Figura 4.6) para o isolamento elétrico. Existe ainda outro tipo de tubos constituídos por metal e cerâmica, sendo o isolamento elétrico efetuado pela cerâmica [4].

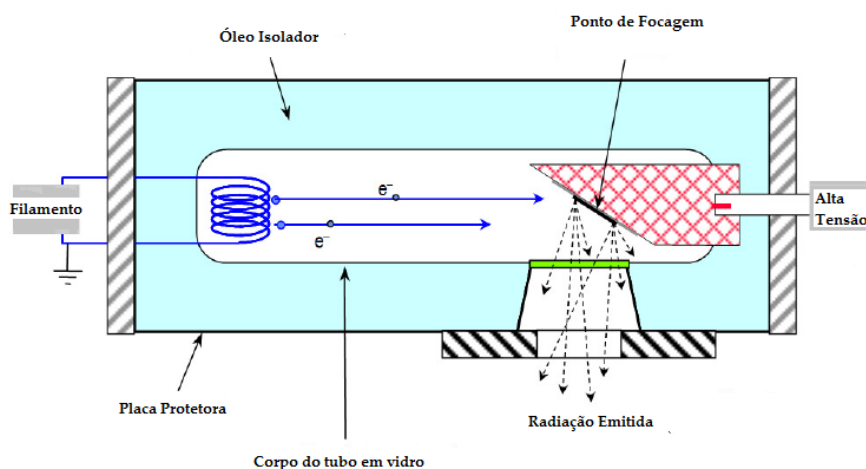


Figura 4.6: Tubo de raios-X (Adaptado da Ref. [4]).

### 4.3.2 Sistema Ótico

Em  $\mu - XRF$  geralmente são utilizados colimadores ou capilares óticos porque estes transmitem uma vasta gama de energias e são adaptáveis às diferentes necessidades experimentais [4].

Um colimador absorve toda a radiação que não preenche o seu orifício, sendo que esta radiação não sofre quaisquer alterações na distribuição de energia. O tamanho do ponto de focagem do colimador é dado pelo diâmetro do colimador e é limitado através do ângulo sólido de captura da radiação da fonte [4] (ver Figura 4.7.a).

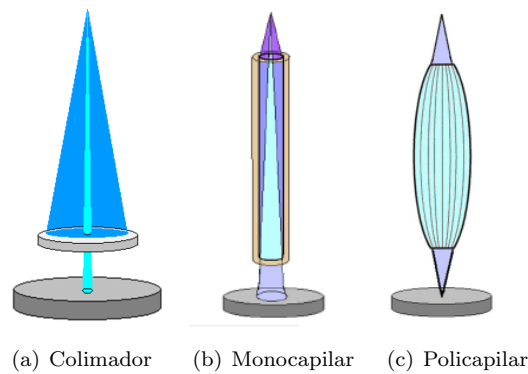


Figura 4.7: Representação dos diferentes constituintes óticos possíveis em XRF (Adaptado da Ref. [4]).

Por outro lado, num capilar duas contribuições da fonte de radiação podem ser capturadas e concentradas na amostra (ver Figura 4.7.b). Parte da radiação penetra no capilar como acontece num colimador, e outra parte é propagada através de reflexão total no interior do capilar. Assim sendo, um ângulo sólido maior de radiação pode ser recolhido o que permite uma amplificação na intensidade de excitação [4].

Existe ainda uma ótica policapilar que tem por base um grande número de capilares individuais (ver Figura 4.7.c) com um diâmetro interno muito pequeno cada um (inferior a 1 ou 2  $\mu m$ ). Através de múltiplas reflexões totais, a direção dos raios-X é alterada e são focalizados na amostra. Deste modo, um grande ângulo sólido de radiação da fonte é capturado e concentra-se numa pequena área da amostra (inferior a 10  $\mu m$ ) [4]. O equipamento utilizado neste trabalho apresenta um policapilar que permite que o feixe seja focado na amostra com um diâmetro de 25  $\mu m$ .

### 4.3.3 Geometria de Excitação

Em  $\mu - XRF$  a excitação pode ter diferentes direções. Na Figura 4.8 o feixe incidente é perpendicular à amostra, ou por outro lado apresenta uma inclinação menor que 90° em relação à mesma.

No caso da excitação perpendicular à amostra e ao mesmo tempo paralela à visualização da mesma, não é relevante que a amostra esteja no plano focal, uma vez que a posição vista da amostra é sempre excitada. Contudo nesta geometria, sendo o microscópio ótico e o feixe incidente paralelos, torna-se difícil a utilização das duas ferramentas simultaneamente, acontecendo que geralmente o



Figura 4.8: Geometria da excitação. Na imagem da esquerda está representada uma incidência perpendicular à amostra. Na imagem da direita observa-se que a radiação incidente apresenta uma inclinação inferior a  $90^\circ$  com a amostra (Adaptado da Ref. [4]).

ponto de vista da amostra tem de ser conservado para a medição, ou seja, aquando da medição a amostra não está a ser observada [4].

Quando a radiação incidente apresenta uma inclinação inferior a  $90^\circ$  com a amostra, é necessário que esta se encontre no plano focal. Só desta forma se torna possível que a medição se realize na posição de vista da amostra. Nesta direção de excitação o fundo espectral é reduzido e a posição real de medição pode ser observada [4]. O aparelho utilizado neste trabalho apresenta esta geometria de excitação.

#### 4.3.4 Detetor

Um detetor de raios-X consiste em duas partes básicas, o transdutor e um circuito de formação de impulsos. O transdutor tem como função converter a energia dos fótons de raios-X em corrente elétrica enquanto que o circuito de formação de impulsos transforma a corrente em impulsos de tensão que são contados e/ou integrados por equipamentos de contagem. As propriedades mais importantes num detetor são a sua eficiência, a linearidade, proporcionalidade de energia e resolução [30].

A eficiência caracteriza-se pela capacidade do detetor em recolher a radiação que nele incide [30].

Por outro lado, o processo de conversão de fótons de raios-X para impulsos de tensão é extremamente rápido, o que leva a que se o fluxo de fótons é muito grande, um fóton que chega ao detetor enquanto este ainda está a processar a conversão do fóton de raios-X anterior, poderá ser perdido. O tempo necessário para o detetor recolher um fóton, convertê-lo num impulso e contar o impulso está relacionado com o tempo morto ( $\tau$ ) do detetor. A fração de fótons que pode não ser convertida é descrita pela linearidade do detetor. O detetor é linear quando existe uma proporcionalidade direta entre a taxa de fótons que incide sobre o detetor e a taxa de produção de impulsos de tensão. Quando tal linearidade não se verifica faz-se referência ao tempo morto [30].

A amplitude de um impulso de tensão de saída é dependente da corrente produzida no transdutor. Deste modo, a amplitude do impulso de tensão de saída é diretamente proporcional à energia do fóton incidente. Quando assim acontece, diz-se que o detetor é proporcional [30].

A resolução é a medida da capacidade do detetor de distinguir dois fótons de raios-X com energias distintas [30]. A resolução de energia do detetor é convencionalmente definida pela largura a meia altura (da sigla em inglês *FWHM* - *Full Width Half Maximum*) da distribuição medida (ver Figura 4.9) [37].

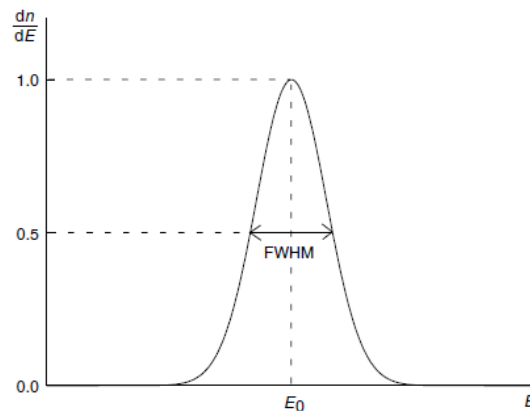


Figura 4.9: Visualização ampliada do pico de energia centrado em  $E_0$  e medido através de um detetor. A FWHM do pico correspondente é utilizada como medida de resolução (Adaptado da Ref. [37]).

Quanto maior for a largura a meia altura mais difícil se torna a identificação dos picos que correspondem a fótons de energias próximas [37]. Deste modo, à medida que a FWHM diminui, o detetor apresenta uma maior capacidade para distinguir diferentes energias de raios-X [30].

Existem diferentes tipos de detetores utilizados na análise de fluorescência de raios-X, nomeadamente: detetor de gás, detetor de Si(Li) e SDD (do inglês Silicon-Drift-Detector). O aparelho utilizado neste trabalho utiliza um SDD que foi desenvolvido recentemente com uma estrutura especial em anel que permite uma redução do ruído eletrónico no detetor. Esta redução do ruído eletrónico leva a uma diminuição da filtragem eletrónica, o que significa que as taxas de contagem podem melhorar porque o tempo de filtragem é baixo [4].

#### 4.3.5 Análise Espectral

Para a avaliação dos espectros é necessário identificar os picos e os artefactos (nomeadamente picos de escape, picos de soma e picos de dispersão) [4].

As energias conhecidas das linhas características de raios-X de cada elemento estão armazenadas numa base de dados. Deste modo, a identificação dos elementos num determinado espectro medido é normalmente realizada através da comparação iterativa entre as linhas espectrais medidas e as respetivas energias guardadas [38] (ver Figura 4.10).

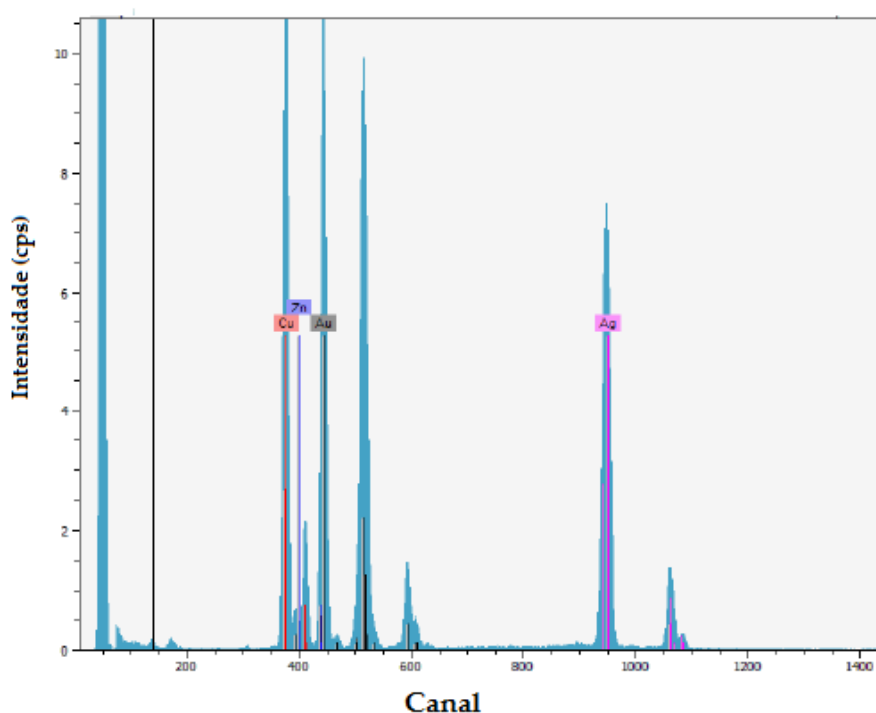


Figura 4.10: Representação de um espectro medido e identificação dos elementos (Adaptado da Ref. [38]).

Os raios-X que atingem o detector interagem com ele através de processos de dispersão, excitação de fótons e absorção eletrônica em camadas mais externas ou internas [4]. Quando a energia dos fótons que atingem o detector é superior ao limite de absorção da camada  $K$  do Si (material do detector) também é produzida radiação de fluorescência do Si. Normalmente esta radiação é imediatamente absorvida pelo detector e contribui juntamente com o fóton inicial incidente de raios-X para a carga total recolhida pelo detector. No entanto, há a possibilidade dessa radiação escapar do detector sendo a sua energia perdida e os fótons detectados apresentarem uma energia reduzida em  $1,74 \text{ keV}$ . Isto gera um pico no espectro de raios-X com uma posição de menor energia - pico de escape [24].

Um outro tipo de artefato possível, os picos de soma, são originados através da detecção simultânea de dois fótons com uma diferença de tempo extremamente pequena. A eletrônica do detector não consegue distinguir entre esses dois fótons, considerando os dois juntos como sendo um só e, consequentemente com uma energia igual à soma dos dois [4].

A radiação proveniente do tubo sofre dispersão na amostra em todas as direções. Esta radiação com origem na dispersão é a fonte mais importante do fundo espectral nos espectros de XRF. Tanto a radiação de bremsstrahlung como a radiação de fluorescência sofrem dispersão (processo explicado na secção 4.2.2). Devido à dispersão de Rayleigh, o espectro medido apresenta um pico na posição da linha característica de fluorescência do material do alvo do tubo, ou seja, do Rh. Já devido à dispersão de Compton, o espectro apresenta um pico a uma energia mais baixa [4] (ver Figura 4.11).



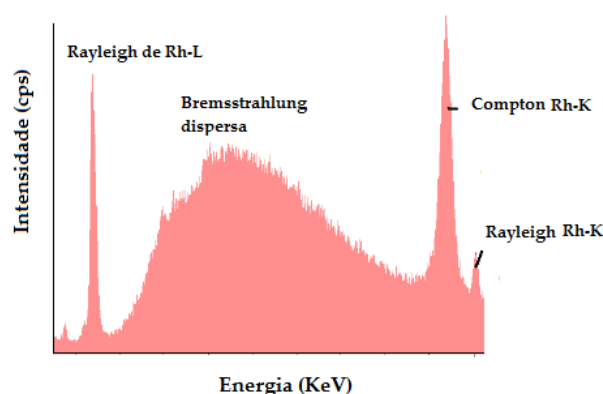


Figura 4.11: Representação da Radiação de Bremsstrahlung dispersa e dos picos de Compton e Rayleigh (Adaptado da Ref. [4]).

#### 4.3.6 Análise Quantitativa

A análise quantitativa em XRF consiste na conversão da intensidade de fluorescência medida em concentração dos elementos da amostra analisada. O método de parâmetros fundamentais permite essa análise através dos fundamentos matemáticos desenvolvidos por Sherman, Shiraiwa e Fujino. Este método tem por base parâmetros físicos tais como coeficientes de atenuação, probabilidades de transição e rendimentos de fluorescência [37] e não necessita de amostras padrões.

Por outro lado, é possível uma quantificação mais simples utilizando retas de calibração com amostras padrão com composição conhecida. Isto significa que comparando a matriz dos padrões com a amostra que está a ser analisada pode ser feita uma correlação direta entre a intensidade de raios-X medido e a composição elemental. Esta é a base do método de quantificação denominado de modo de comparação do Software WinAXIL utilizado neste trabalho [39]. A Figura 4.12 representa a reta de calibração para o elemento P. No eixo das ordenadas temos a quantificação conhecida das amostras padrões e no eixo das abcissas as contagens obtidas através das medidas de  $\mu - XRF$ . Deste modo, é através desta reta de calibração que o WinAXIL quantifica o P em todas as amostras. Tal procedimento repete-se para os outros elementos.

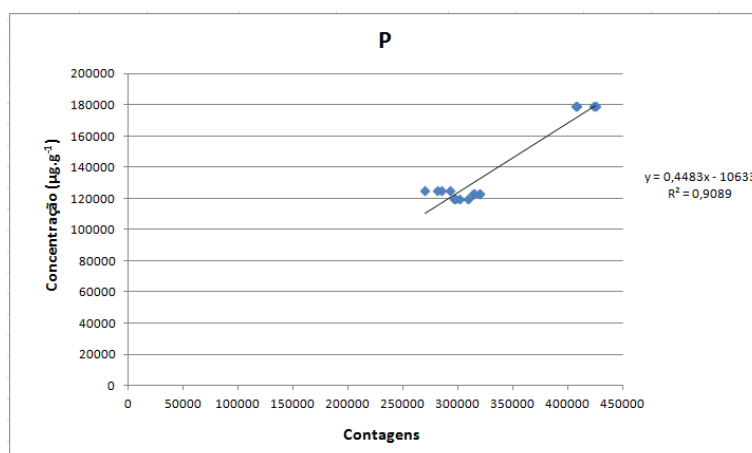


Figura 4.12: Reta de Calibração para o P através da qual o WinAXIL quantifica as amostras do estudo.

De referir que o feixe apresenta um diâmetro de  $25\ \mu\text{m}$ , abaixo da homogeneidade natural das amostras padrão. Isso causa variações nas concentrações de ponto para ponto, o que reflete um valor de  $R^2$  da reta anterior, não muito bom e consequentemente em incertezas de quantificação elevadas.

#### 4.3.7 Incertezas Associadas

Para a interpretação correta de qualquer resultado analítico é necessário conhecer as incertezas associadas e a sua influência.

Os erros instrumentais que influenciam a precisão do instrumento podem ter diferentes origens: desvios em determinados componentes devido a condições ambientais ou ao próprio envelhecimento, reprodutibilidade mecânica insuficiente, como por exemplo, o mau posicionamento da amostra. Erros sistemáticos instrumentais (por exemplo, os desvios dos componentes) podem ser compensados através da monitorização de várias medidas. Por outro lado erros aleatórios (por exemplo, o mau posicionamento da amostra) não podem ser compensados. A incerteza instrumental não deve dominar a incerteza total de uma análise [4].

Outra fonte de incertezas muito importante é a própria amostra. A preparação da amostra não a deve alterar por meio de contaminação, dissolução incompleta, etc. Em análises de  $\mu - XRF$  é completamente requerido que se evitem contaminações uma vez que este método é de alta sensibilidade, o que leva a que pequenas contaminações possam perturbar os resultados analíticos. É também muito importante o correto posicionamento da amostra no próprio instrumento [4].

Por fim, resultados fiáveis estão dependentes ainda de uma quantificação correta. Neste campo também são possíveis uma série de erros. Como a quantificação utilizada neste trabalho tem por base padrões, tem de ser assegurado que as condições de medição, nomeadamente condições de excitação e geometria da amostra, são as mesmas para os padrões e para as amostras a analisar. No mesmo seguimento, a calibração depende do conhecimento exato da composição dos padrões [4].

## Capítulo 5

# Emissão de Radiação Gama Induzida por Protões

### 5.1 Reações Nucleares

Quando um feixe de partículas carregadas (por exemplo, protões) incide sobre um alvo, interage com os eletrões ou com os núcleos dos átomos do material desse alvo. A probabilidade das partículas carregadas interagirem com os eletrões é cerca de  $10^{15}$  maior do que com o núcleo, isto porque o núcleo ocupa apenas cerca de  $10^{-15}$  do volume de um átomo [40].

Havendo interação das partículas carregadas com o núcleo, esta pode ser Coulombiana (ocorre dispersão de Rutherford) ou por outro lado pode haver intervenção do potencial nuclear o que poderá originar uma reação nuclear. A probabilidade de ocorrer dispersão Coulombiana ou dispersão nuclear depende de fatores como a energia da partícula incidente e o parâmetro de impacto,  $b$ , relativo ao núcleo do alvo (ver Figura 5.1) [41].

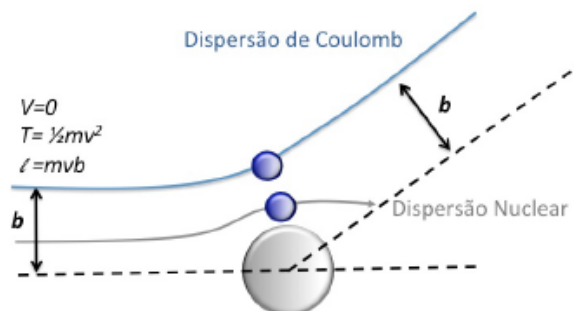


Figura 5.1: Na figura está representada a trajetória da partícula incidente quando se aproxima do núcleo de um alvo.  $V$  representa a energia potencial,  $T$  a energia cinética,  $v$  a velocidade da partícula,  $l$  o momento angular e  $b$  o parâmetro de impacto (Adaptado da Ref. [5]).

Quando a energia da partícula incidente é suficiente para se aproximar do núcleo a uma distância dentro do alcance da força nuclear forte, dá-se a excitação nuclear que pode levar a um decaimento para um nível mais estável através da emissão de radiação -  $\gamma$ . A energia desta radiação

emitida corresponde à diferença em energia entre os estados do núcleo, sendo desprezada uma correção para o recuo do mesmo [41] .

Tipicamente uma reação nuclear é representada pela seguinte forma:

$$a + X \longrightarrow Y + b \quad (5.1)$$

onde  $a$  representa o projétil acelerado,  $X$  o núcleo do alvo,  $Y$  o núcleo resultante da interação e  $b$  a partícula emitida. Em alternativa a mesma reação pode apresentar-se do seguinte modo:

$$X(a, b)Y \quad (5.2)$$

que é conveniente, uma vez que de uma forma natural refere-se a uma classe geral de reações com propriedades comuns, por exemplo, ( $\alpha, n$ ), ( $n, \text{gama}$ ), ( $p, \text{gama}$ ) ou ( $p, p' \text{gama}$ ) [40]. A reação nuclear inelástica com a respetiva nomenclatura  $^{31}\text{P}(p, p' \text{gama})^{31}\text{P}$  será a utilizada neste trabalho e apresenta-se desta forma uma vez que um protão é acelerado contra um alvo e da colisão resulta outro núcleo e radiação gama.

Relativamente ao processo de interação podem considerar-se dois tipos de reações, as reações nucleares diretas e de núcleo composto. No caso da reação nuclear direta, a partícula incidente interage periféricamente com o núcleo, transferindo a sua energia para poucos nucleões. Assim sendo, a reação acontece em apenas dois passos:  $a + A \Rightarrow B + b$ . Por outro lado, na reação nuclear de núcleo composto, a energia transferida pela partícula incidente é partilhada por todos os nucleões e o sistema perde a "memória" do canal de entrada. Deste modo, existe um passo intermédio:  $a + A \Rightarrow C \Rightarrow B + b$ , sendo  $C$  o núcleo composto [5].

## 5.2 PIGE

Na técnica denominada de Análise com Reações Nucleares (do acrónimo inglês NRA - *Nuclear Reactions Analysis*) um alvo desconhecido é bombardeado e as reações nucleares conhecidas observadas. NRA faz parte das técnicas analíticas de feixes de iões IBA que permitem o estudo da composição de uma grande variedade de amostras. Outras técnicas IBA são PIGE, RBS (*Rutherford Backscattering Spectrometry*), ERD (*Elastic Recoil Detection*) e PIXE (*Particle Induced X-Ray Emission*), que são diferentes entre si devido às distintas interações entre as partículas incidentes e o alvo [5].

As técnicas de NRA, PIGE e PIXE dependem de processos inelásticos (com produção de raios-X e raios -  $\gamma$ ) que permitem a determinação de elementos leves e pesados. A técnica de PIGE, utilizada neste trabalho, consiste no bombardeamento da amostra com um feixe de protões e análise dos raios -  $\gamma$  consequentemente emitidos para a caracterização dos elementos leves da amostra [5].

Na década de 60, grupos de trabalhos experimentais demonstraram que a partir das emissões de radiação gama podiam ser determinadas as quantidades de Magnésio, Flúor, Oxigénio, Carbono e Silício. Nessa década, os detetores utilizados eram de Iodeto de Sódio ativado com Tálio, NaI(Tl), e apresentavam baixa resolução, o que limitava as experiências à análise de apenas um ou dois elementos. Na década seguinte, com o aparecimento dos detetores de cristais de Germânio com iões de Lítio, Ge(Li), análises multi-elementais tornaram-se possíveis a partir da técnica de PIGE. Atualmente, são utilizados detetores de Germânio de alta pureza, Ge(HP) [5].

### 5.2.1 Secção Eficaz

A secção eficaz mede a probabilidade relativa da reacção ocorrer. Se tivermos um detetor posicionado para coletar a partícula emitida  $b$  na direcção  $(\theta, \phi)$  tendo em conta a direcção do feixe incidente, o detetor define um pequeno ângulo sólido,  $d\Omega$ , com o núcleo do alvo (ver Figura 5.2) [40].

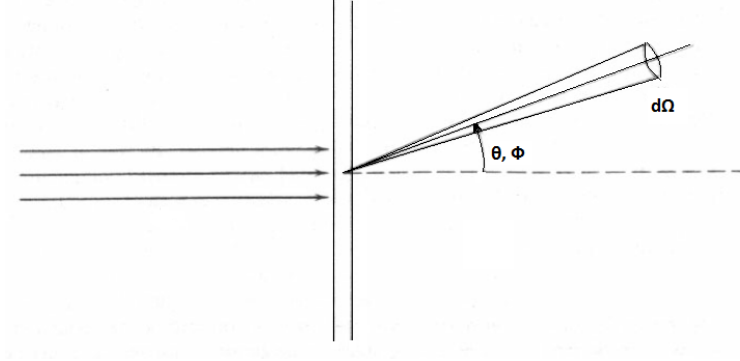


Figura 5.2: Ilustração do feixe incidente, alvo e feixe de saída de ângulo sólido  $d\Omega$  e direcção  $(\theta, \phi)$  (Adaptado da Ref. [40]).

Sendo a corrente das partículas incidentes  $I_a$  por unidade de tempo,  $N$  o número de núcleos do alvo por unidade de área e  $R_b$  a taxa de produção da partícula  $b$ , então a secção eficaz,  $\sigma$ , é dada por:

$$\sigma = \frac{R_b}{I_a N} \quad (5.3)$$

e, embora tenha dimensão de área é proporcional à probabilidade de reacção [40].

Como foi dito anteriormente, o detetor ocupa apenas um pequeno ângulo sólido  $d\Omega$ , logo não observa todas as partículas de saída. Deste modo, apenas uma fração  $dR_b$  é contada e, portanto, apenas uma fração da secção eficaz é deduzida,  $d\sigma$ . Por outro lado, geralmente as partículas de saída não são emitidas uniformemente em todas as direcções. Contudo, apresentam uma distribuição angular que é dependente de  $\theta$  e possivelmente também de  $\phi$  e que pode ser representada por  $r(\theta, \phi)$ . Assim vem que:

$$dR_b = \frac{r(\theta, \phi) d\Omega}{4\pi} \quad (5.4)$$

logo, a secção eficaz diferencial é dada por:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{r(\theta, \phi)}{4\pi I_a N} \quad (5.5)$$

A secção eficaz da reacção,  $\sigma$ , pode ser obtida integrando  $\frac{d\sigma}{d\Omega}$  para todos os ângulos. Assim sendo e com  $d\Omega = \sin(\theta) d\theta d\phi$  temos [40]:

$$\sigma = \int \frac{d\sigma}{d\Omega} d\Omega = \int_0^\pi \sin(\theta) d\theta \int_0^{2\pi} \frac{d\sigma}{d\Omega} d\phi \quad (5.6)$$

Geralmente as reacções têm geometria axial, logo  $\frac{d\sigma}{d\Omega}$  é independente de  $\phi$ , portanto:

$$\sigma = \int_0^{2\pi} 2\pi \sin(\theta) \frac{d\sigma}{d\Omega} d\theta \quad (5.7)$$

o que perante uma emissão isotrópica, leva a:

$$\sigma = 4\pi \frac{d\sigma}{d\Omega} \quad (5.8)$$

As reações estudadas neste trabalho, tais como a reação  $^{31}\text{P}(\text{p}, \text{p}'\gamma)^{31}\text{P}$ , no que diz respeito à emissão de radiação gama, possuem uma distribuição isotrópica [5].

### 5.2.2 Poder de Paragem

As partículas incidentes, à medida que atravessam o alvo, interagem com os átomos deste e, consequentemente vão perdendo energia ao longo do percurso (ver Figura 5.3).

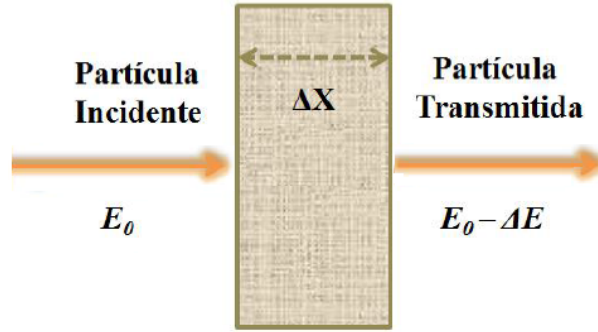


Figura 5.3: Representação da transmissão de partículas por um alvo fino.  $E_0$  representa a energia das partículas incidentes,  $\Delta E$  a energia perdida pelas mesmas e  $\Delta X$  a espessura do alvo (Adaptado da Ref. [42]).

Os dois principais processos que contribuem para essa perda de energia são a interação Coulombiana da partícula incidente com os eletrões ligados ou livres (poder de paragem eletrónico,  $S_e$ ) e a interação com os núcleos dos átomos (poder de paragem nuclear,  $S_N$ ). O poder de paragem da partícula incidente,  $S$ , é dado pela soma das componentes eletrónica e nuclear [5]:

$$S = S_e + S_N \quad (5.9)$$

O poder de paragem representa a diminuição da velocidade ou a energia perdida por unidade de comprimento da partícula incidente à medida que esta vai atravessando o material [5]:

$$S = -\left(\frac{dE}{dx}\right) \quad (5.10)$$

O poder de paragem depende da espessura do alvo e não da densidade superficial atómica, logo é mais adequada a utilização da seção eficaz de paragem [5]:

$$\varepsilon(E) = \frac{S}{N} \quad (5.11)$$

sendo  $S$  o poder de paragem e  $N$  a densidade atómica do elemento.

A perda de energia associada a compostos é obtida pela Lei de Bragg. Segundo esta lei um composto que apresente dois elementos  $A$  e  $B$  na proporção  $A_mB_n$ , apresentará uma seção eficaz de paragem,  $\varepsilon^{AB}$ , que é dada pela média pesada das seções eficazes de paragem parciais,  $\varepsilon^A$  e  $\varepsilon^B$ :

$$\varepsilon^{AB} = m\varepsilon^A + n\varepsilon^B \quad (5.12)$$

sendo  $m$  e  $n$ , a quantidade do elemento  $A$  e  $B$ , respetivamente, no composto.

As amostras do presente trabalho são espessas, logo o poder de paragem é extremamente relevante para o cálculo do rendimento e utilizado como input no ERYA.

### 5.2.3 Ressonâncias

A secção eficaz de uma reação em função da energia da partícula incidente, representa a função de excitação da reação. Quando essa curva formada pela seção eficaz apresenta ressonâncias, significa que os valores de energia correspondentes coincidem com os estados excitados do núcleo composto (Ver Figura 5.4).

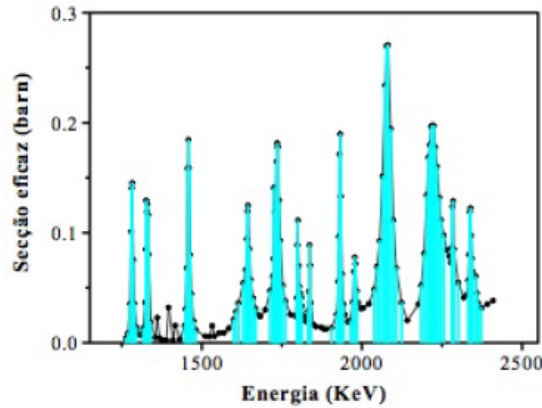


Figura 5.4: Representação da seção eficaz da reação  $^{23}\text{Na}(p,p'\gamma)^{23}\text{Na}$  em função da energia incidente e as respetivas ressonâncias (Adaptado da Ref. [5]).

O aparecimento de uma ressonância para determinada energia incidente pode ser então associado à formação de estados de longa vida do sistema de núcleo composto. O estado de núcleo composto decai com emissão da partícula original, ou outra partícula. Por vezes, há ainda, emissão de radiação gama. Qualquer estado excitado decai com uma probabilidade de  $\frac{1}{\tau}$ , onde  $\tau$  é o tempo de vida médio do estado. Sendo este tempo finito, de acordo com o princípio de incerteza, há imprecisão da energia do estado. Esta incerteza, em energia, é denominada por largura natural do estado, é representada por  $\Gamma$  e é igual à probabilidade do decaimento multiplicada por  $\hbar$  [5].

O conhecimento das ressonâncias é fundamental para a análise em profundidade utilizando a técnica PIGE. A análise em profundidade é realizada tendo o conhecimento destas ressonâncias, da energia a que ocorrem, bem como, da energia da radiação -  $\gamma$  emitida [41].

Quando um feixe de energia correspondente à energia de uma ressonância fina,  $E_R$ , incide sobre uma amostra, a reação de ressonância irá ocorrer à superfície desta. Se a energia do feixe

incidente ( $E_0$ ) for superior a  $E_R$  a reação irá ocorrer a uma maior profundidade na amostra, isto porque só ocorrerá quando o feixe perder energia até atingir  $E_R$ . O rendimento detetado reflete a concentração à profundidade que a reação ocorre. Assim sendo, uma curva do rendimento em função da energia  $Y(E_0)$  fornece a informação sobre a distribuição da concentração ao longo da profundidade [41].

É necessário considerar a seção eficaz de ressonância,  $\sigma_{ab}(E)$ , a largura natural de ressonância, a resolução de energia do feixe e a dispersão em energia que o feixe sofre desde que incide na amostra até atingir a energia de ressonância para se conhecer o perfil de concentração em profundidade. A seção eficaz de uma ressonância isolada e fina é dada pela fórmula de Breit-Wigner:

$$\sigma_{ab}(E) = \frac{\pi\gamma\lambda^2\Gamma_a\Gamma_b}{(E - E_R)^2 + \frac{\Gamma^2}{4}} \quad (5.13)$$

onde a e b correspondem à partícula incidente e partícula de saída, respetivamente;  $\gamma$  é um fator estatístico que inclui o número de spin;  $\lambda$  é o comprimento de onda de Broglie ( $\lambda^2 \sim \frac{1}{E_0^2}$ );  $\Gamma$  é a largura de ressonância e  $\Gamma_a$  e  $\Gamma_b$  as larguras parciais [41].

#### 5.2.4 ERYA

Em 1980, Bordier estabeleceu um método para a aplicação de PIGE em amostras com espessura superior ao alcance das partículas incidentes, definindo que a contabilização do rendimento da emissão da radiação gama depende da integração em profundidade da seção eficaz da reação nuclear em estudo. Nessa altura utilizavam-se amostras padrão com composição e espessuras conhecidas, sendo as medições experimentais realizadas nas mesmas condições que as medições da amostra a analisar [5].

Nos últimos anos, o grupo de reações nucleares do LibPhys-UNL desenvolveu um método alternativo para análises através de PIGE de elementos leves em amostras espessas, sem recurso a padrões, desenvolvendo o código designado por ERYA (acrónimo em Inglês de *Emitted Radiation Yield Analysis*) [5].

O programa ERYA permite determinar as frações mássicas dos elementos leves de uma amostra, quer seja fina ou espessa, com composição desconhecida, sem recurso a padrões. Tal é conseguido através dos rendimentos das várias emissões de radiação gama coletadas a uma energia incidente ( $E$ ) [41].

No caso de um alvo fino o rendimento diferencial para um certo isótopo  $i$  de um determinado elemento é dado por:

$$dY(E_0) = \varepsilon_{abs}(E_\gamma) \left(\frac{Q}{e}\right) \sigma(E_0) f_m f_i N_{AV} A^{-1} d\Gamma \quad (5.14)$$

sendo  $\varepsilon_{abs}(E_\gamma)$  a eficiência absoluta do sistema de deteção à energia emitida  $E_\gamma$ ,  $\frac{Q}{e}$  o número de protões incidentes,  $\sigma(E)$  a seção eficaz de produção de raios gama do elemento para a energia incidente  $E_0$ ,  $f_m$  a fração mássica,  $f_i$  a abundância do isótopo  $i$ ,  $N_{AV}$  o número de Avogrado,  $A$  a massa atómica do elemento e  $d\Gamma$  a espessura da amostra em unidades de massa por área [41].

Quando a amostra tem uma espessura superior ao alcance dos iões incidentes, o rendimento é dado por:



$$dY(E_0) = \varepsilon_{abs}(E_\gamma) \left(\frac{Q}{e}\right) \sigma(E_0) f_m f_i N_{AV} A^{-1} \int_0^R \sigma(\Gamma) d\Gamma \quad (5.15)$$

O ERYA, desenvolvido em LabView National Instrumentions, possui uma base de dados onde está disponível a informação da abundância isotópica, massa e número de massa de todos os elementos da tabela periódica. Para alguns elementos, está também disponível a secção eficaz da reação nuclear associada à emissão gama que se pretende estudar[41].

O utilizador começa por introduzir uma matriz inicial que pode ser apenas baseada no conhecimento químico ou, na informação de uma outra técnica, neste caso de  $\mu - XRF$ . De seguida, o utilizador escolhe o elemento ou isótopo que pretende estudar e a respetiva emissão gama, caso exista mais que uma o programa pede ao utilizador para escolher apenas a que se pretende analisar. Posteriormente através do algoritmo Levenber-Marquart todos os rendimentos calculados para os elementos presentes no espetro são ajustados e a composição inicial inserida pelo utilizador é aferida iterativamente [41].



## Capítulo 6

# Procedimento Experimental

Este estudo teve a colaboração do Dr. Veterinário Martinho Capelão do Hospital Veterinário do Restelo que disponibilizou as amostras. Como foi explicado nos capítulos iniciais, um dos problemas relacionados com este tema é o facto de ser bastante difícil se conseguir amostras de ossos displásticos de cães. Assim sendo, aproveitaram-se as amostras de cabeças de fémur de cão preparadas em formol que o Dr. Capelão tinha, para se fazer também um estudo da forma como a preparação das amostras ósseas influenciam os resultados finais. O Dr. Capelão tentou disponibilizar mais amostras de cabeças de fémur de cão para este estudo, no entanto apenas conseguiu amostras de cabeças de fémur de gato.

Assim, no presente trabalho, analisaram-se dois tipos diferentes de amostras: amostras provenientes da articulação canina e amostras de cabeças de fémur de cão e de gato. As diferentes amostras foram analisadas por duas técnicas:  $\mu$  - XRF e PIGE. De seguida, é descrito todo o tratamento das amostras e a forma como se procedeu à posterior análise qualitativa e quantitativa.

### 6.1 Preparação das Amostras

#### 6.1.1 Ossos da Articulação do Cotovelo Canino

Foram fornecidas pelo Doutor Martinho Capelão, Veterinário do Hospital Veterinário do Restelo, 3 amostras de fragmentos retirados em três cirurgias realizadas por ele. Estas 3 amostras não eram muito recentes, tinham cerca de um ano e por essa razão foi complicado para o Doutor Martinho conseguir os dados dos cães a que cada amostra correspondia. No entanto, uma destas amostras doentes pertencia a uma cadela de raça Dogue de Bordeaux com 5 meses de idade.

As 3 amostras doentes referidas anteriormente estavam armazenadas em água oxigenada. Procedeu-se à sua secagem num liofilizador de marca Edwards durante cerca de dois dias. Depois de secas as amostras foram montadas em caixas de petri com fita de carbono, estando preparadas para as medidas através de  $\mu$  - XRF.

Uma quarta amostra, da mesma altura que as referidas anteriormente, também foi fornecida pelo veterinário. No entanto esta foi armazenada em água destilada e posteriormente seca, e foi nesse estado que foi recebida, encontrando-se portanto já nas condições para medidas.

É de salientar que as 4 amostras referidas até agora eram pequenos fragmentos rugosos e representam o conjunto de amostras doentes do presente trabalho.

Como controlo, o Doutor Martinho, conseguiu um osso da articulação de um cão que faleceu, mas que não apresentava qualquer problema a nível ósseo. Esta amostra passou 2 dias em água destilada e, de seguida, esteve durante um dia no liofilizador para a sua secagem. Depois, tal como as três primeiras amostras referidas anteriormente, foi montada numa tampa de caixa de petri através de fita de carbono (Ver Figura 6.1) estando preparada para as medidas de  $\mu$  - XRF.



Figura 6.1: Fotografia da amostra controlo depois de seca, estando preparada para as medidas de  $\mu$  - XRF. A amostra encontra-se sobre fita de carbono que por sua vez está colada numa tampa de uma caixa de petri.

Estas amostras, tanto as doentes como de controlo, foram analisadas através de  $\mu$  - XRF no estado descrito anteriormente mas também na forma de pastilha. Ou seja, após a análise das amostras no seu estado normal, estado rugoso, estas foram prensadas numa prensa de marca Specac tendo sido aplicado um peso de 10 toneladas durante 60 segundos. De seguida as amostras foram retiradas da prensa e colocadas em slides com folha de mylar na qual se colocou um pouco de cola para a pastilha aderir (ver Figura 6.2). Deste modo, as amostras estavam preparadas para uma segunda medição através de  $\mu$  - XRF .



Figura 6.2: Montagem de slide com folha de mylar que é utilizada para colocação das pastilhas quando retiradas da prensa.

### 6.1.2 Cabeças de Fémur

Foram analisadas 4 amostras de cabeças de fémur, 2 pertencentes a cães e as outras 2 a gatos. As 2 amostras de cabeças de fémur canino, o veterinário conseguiu-as sensivelmente há um ano, tendo uma sido mantida durante esse período em formol e outra em água destilada. A primeira coisa que se fez com estas duas amostras foi cortá-las em fatias na máquina de corte cujo modelo é Buehler (ver Figura 6.3) na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa com a imprescindível ajuda da Professora Dra. Ana Filipa Chasqueira. As amostras de cabeças de fémur foram coladas numa aplicação de silicone que é fixada na máquina e depois seguem-se os cortes com a lâmina de diamante.



Figura 6.3: Fotografia da máquina de corte da faculdade de medicina dentária.

A amostra de cabeça de fémur que estava anteriormente em formol foi cortada em 8 fatias: uma apresentava 0,4 mm de espessura, duas 0,6 mm e as restantes 5 tinham 1,6 mm (ver Figura 6.4). Já a amostra de cabeça de fémur que estava em água destilada foi cortada em 7 fatias: 4 com 0,6 mm

de espessura e as outras 3 com 1,6 mm.

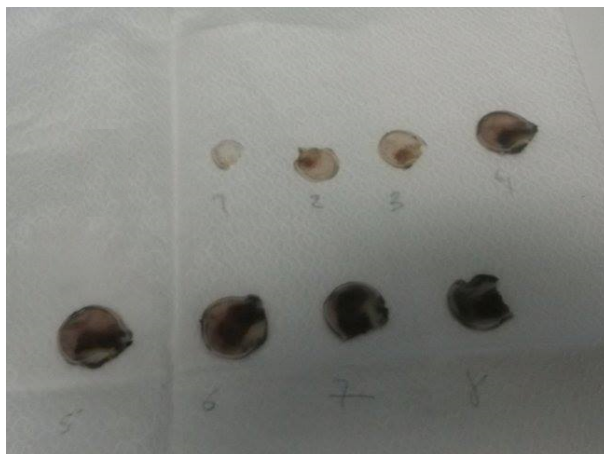


Figura 6.4: Imagem das amostras cortadas da cabeça de fêmur que estava anteriormente contida em formol.

Depois de cortadas as amostras foram colocadas durante 2 dias no liofilizador para secarem. Posteriormente o procedimento repete-se, as amostras são colocadas sobre fita de carbono em tampas de caixas preti estando em condições para as medidas de  $\mu$  - XRF.

As outras 2 amostras de cabeças de fêmur de gato foram recolhidas pelo veterinário em Julho do presente ano (2015). Estas duas amostras foram tratadas de forma diferente. Foram mantidas secas até ao seu corte. O corte realizou-se da mesma forma que o descrito anteriormente. Neste caso, cada amostra de cabeça de fêmur foi cortada em 4 fatias de 1,7 mm de espessura cada uma. De seguida, 3 fatias de fêmur foram mantidas em água oxigenada, outras 3 em formol e as restantes 2 em água destilada. Ou seja, as fatias do fêmur 1 foram mantidas em água oxigenada e formol, por outro lado, foi denominado de fêmur 2 aquele em que as fatias foram contidas em formol e água destilada. As amostras foram mantidas nas respetivas soluções durante 20 dias. Depois procedeu-se à secagem das mesmas durante 2 dias no liofilizador. Para finalizar, foram colocadas sobre fita de carbono em caixas preti para poderem ser analisadas através de  $\mu$  - XRF.

Todas as amostras, tanto as cabeças de fêmur como os fragmentos ósseos da articulação do cotovelo, em primeiro foram analisadas por  $\mu$  - XRF e depois por PIGE. Para a análise através de PIGE as amostras não sofreram nenhum tratamento adicional ao que já foi referido anteriormente. Apenas foi necessário colocá-las no porta amostras da câmara da linha de reações nucleares do acelerador Tandem (ver Figura 6.5) do CTN/IST (CAMPUS Tecnológico Nuclear- Instituto Superior Técnico).



Figura 6.5: Imagem do porta amostras da câmara da linha de reações nucleares do acelerador tandem carregado com 4 amostras. Tomando o sentido de cima para baixo temos que as duas primeiras amostras são de cabeça de fêmur canino previamente guardadas em água destilada, a terceira é uma amostra de osso correspondente a um coronoide doente que foi conservada em água oxigenada e, por último temos outra amostra de cabeça de fêmur canino mas que foi mantida em formol até à sua análise.

## 6.2 Análise Qualitativa e Quantitativa

### 6.2.1 $\mu$ - XRF

Neste trabalho a análise de  $\mu$  - XRF foi feita através do sistema (M4 *Tornado*<sup>TM</sup>, Bruker, Alemanha), com as características e condições referidas anteriormente (ver secção 4.4).

As amostras ósseas foram colocadas na plataforma do equipamento de  $\mu$  - XRF e a análise elemental foi realizada com uma tensão de 50 kV e uma corrente de 100  $\mu$ A. Não foram utilizados filtros entre o tubo e a amostra de forma a aumentar a ionização dos elementos com menor  $Z$ . As medições foram realizadas em vácuo sob uma pressão de 20 mbar e em dois modos diferentes, através da análise pontual das regiões de interesse, e por outro lado através da análise da área de interesse.

A análise quantitativa dos espectros foi realizada com o software *WinAXIL*<sup>TM</sup> (Camberra, Bélgica). Através deste software foi possível a deconvolução dos espectros obtidos através do Tornado e a realização dos respetivos ajustes (ver Figura 6.6).

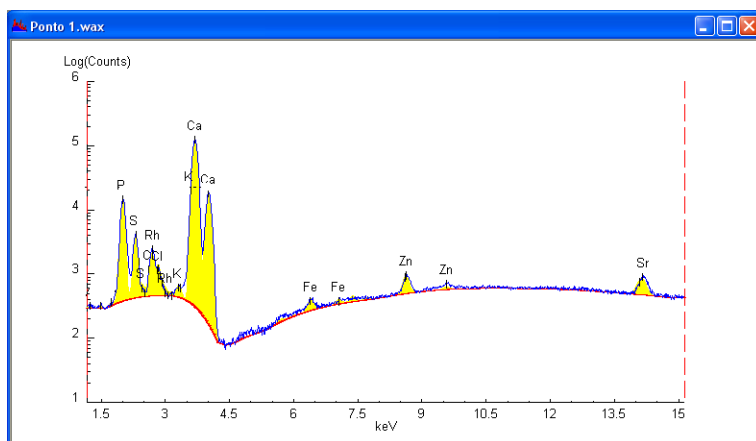


Figura 6.6: A imagem representa o ajuste do espectro correspondente ao Ponto 1 da análise das medidas da amostra controlo.

Utilizaram-se 4 amostras padrão (BONE ASH, BONE MEAL, NYS RM 05-02 Bovine Bone e NYS RM 05-04 Caprine Bone) com uma matriz semelhante à matriz das amostras em estudo (hidroxiapatite), para se proceder à quantificação através do método modo de comparação. Criou-se um ficheiro de calibração com os ajustes destas amostras (explicado na secção 4.3.6) e a partir dele quantificaram-se as amostras pretendidas (ver figura 6.7). É de salientar que os valores finais apresentados da quantificação são o resultado da média ponderada das várias medidas efetuadas na amostra e da aplicação do Critério de Chauvenet. Este critério especifica que um valor medido pode ser rejeitado se a probabilidade de obter um desvio em relação à média da amostra, supondo-se que a amostra tem o comportamento de uma distribuição normal, é menor que 0,5 [43]. Foi utilizado, de forma a eliminar resultados de experiências que não correram bem.



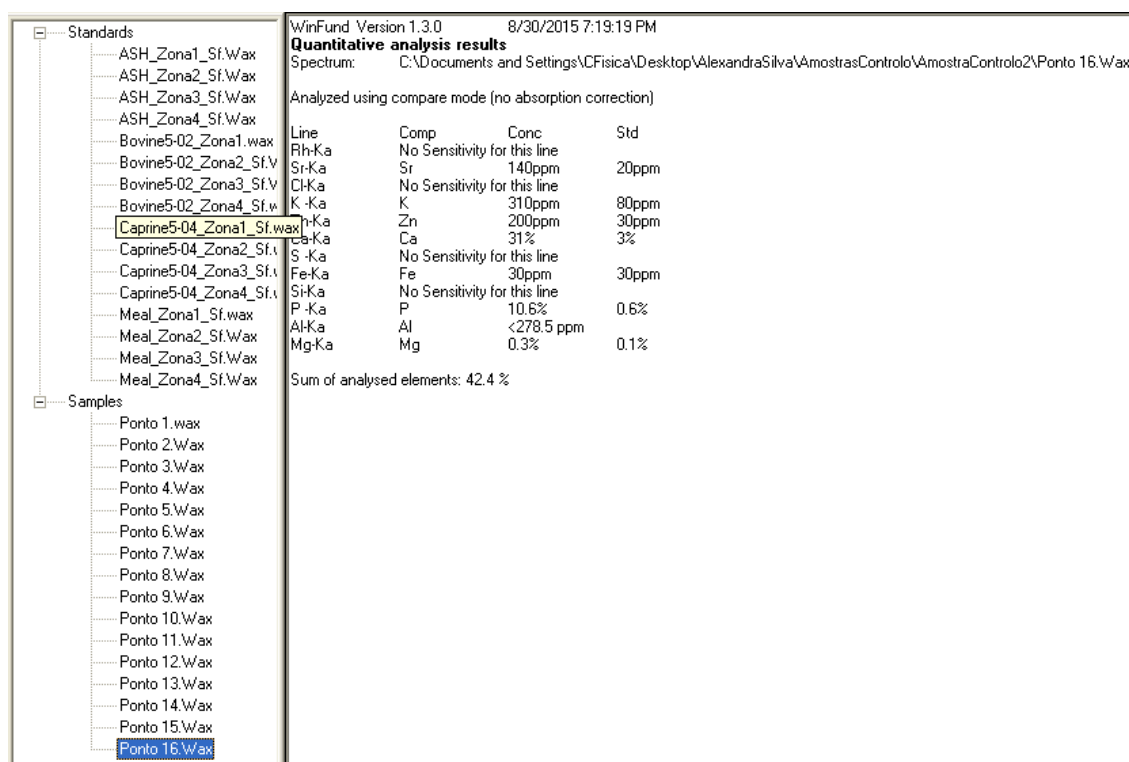


Figura 6.7: Na imagem está representada a interface WinFund através da qual é visível do lado esquerdo em cima os ajustes das amostras controlo, que constituem o ficheiro de calibração, e em baixo os ajustes que se pretende quantificar. Do lado direito observa-se a respetiva quantificação do ajuste selecionado, neste caso o ajuste correspondente ao ponto 16 da amostra controlo.

Com o objetivo de validar as condições experimentais deste trabalho, inicialmente procedeu-se à quantificação dos próprios padrões. Nas quatro tabelas que se seguem estão representados os valores medidos e os valores certificados para cada padrão.

Tabela 6.1: Representação dos valores medidos e certificados da amostra padrão BONE ASH.

Elemento	Valores medidos ( $\mu g.g^{-1}$ )	Valores certificados ( $\mu g.g^{-1}$ )
P	$175000 \pm 8000$	$179100 \pm 1900$
K	$237 \pm 40$	$186 \pm 8$
Ca	$325000 \pm 17000$	$381800 \pm 1300$
Fe	$63 \pm 30$	$660 \pm 27$
Zn	$143 \pm 20$	$181 \pm 3$
Sr	$203 \pm 20$	$249 \pm 7$

Tabela 6.2: Representação dos valores medidos e certificados da amostra padrão BONE MEAL.

Elemento	Valores medidos ( $\mu g.g^{-1}$ )	Valores certificados ( $\mu g.g^{-1}$ )
P	$131000 \pm 5000$	$123000 \pm 1900$
K	$293 \pm 40$	$412 \pm 4$
Ca	$280000 \pm 15000$	$265800 \pm 2400$
Fe	$23 \pm 20$	$99 \pm 8$
Zn	$150 \pm 10$	$147 \pm 16$
Sr	$275 \pm 20$	$264 \pm 7$

Tabela 6.3: Representação dos valores medidos e certificados da amostra padrão NYS RM 05-02 Bovine Bone.

Elemento	Valores medidos ( $\mu g.g^{-1}$ )	Valores certificados ( $\mu g.g^{-1}$ )
Al	$380 \pm 130$	360
P	$125000 \pm 5000$	120000
Ca	$283000 \pm 18000$	260000
Fe	$7 \pm 3$	3,2
Zn	$90 \pm 5$	80
Sr	$180 \pm 20$	160

Tabela 6.4: Representação dos valores medidos e certificados da amostra padrão NYS RM 05-04 Caprine Bone.

Elemento	Valores medidos ( $\mu g.g^{-1}$ )	Valores certificados ( $\mu g.g^{-1}$ )
P	$117000 \pm 6000$	125000
K	$210 \pm 30$	210
Ca	$265000 \pm 12000$	264000
Fe	$5 \pm 3$	2,9
Zn	$90 \pm 10$	81
Sr	$155 \pm 20$	150

Como se pode verificar, o intervalo dos valores quantificados para os elementos dos padrões NYS RM 05-02 Bovine Bone e NYS RM 05-04 Caprine Bone está contido no intervalo dos valores certificados. Por outro lado, no caso dos outros dois padrões não existe tanta precisão na quantificação de alguns elementos, daí se ter usado 4 padrões no sentido de existir uma compensação entre estes e se conseguir no conjunto a quantificação mais precisa possível de todos os elementos pretendidos. No entanto, esta falta de precisão na quantificação elemental destes dois padrões pode ser justificada, nomeadamente pelo facto do pó que dá origem às pastilhas dos padrões já ter alguns anos e não se encontrar nas mesmas condições que no estado original da medida dos valores certificados. Sabe-se também que, por exemplo, no caso do baixo valor medido do Ca no padrão BONE ASH relativamente ao valor certificado é devido à posição do pico de escape (explicado na secção 4.3.5) do Ca coincidir com a posição do pico do P, o que leva a um consequente aumento "falso" de contagens de P. Já relativamente ao Fe, o que acontece é que as nanopartículas magnéticas de ferro das amostras agregam-se e formam grandes aglomerados com um diâmetro semelhante ao diâmetro do feixe do tubo de raios-X. Isto leva a uma quantificação muito mais elevada do que o valor real do ferro se o feixe incide num desses aglomerados ou pelo contrário, a uma quantificação do ferro não precisa, se o feixe não incide num desses aglomerados. Por esta razão, foram feitas medidas pontuais, mas também por áreas, das regiões de interesse de modo a minimizar os efeitos da heterogeneidade dos padrões. Por outro lado, quando o feixe de raios-X incide num aglomerado de nanopartículas de ferro dá-se o efeito denominado de *Inter Elemental Enhancement*, ou seja, a ionização do ferro, leva à excitação dos elementos que o rodeiam e a uma consequente emissão "extra" de radiação de fluorescência que será detetada e levará a um aumento "falso" nos valores da quantificação desses elementos [44, 45, 46].

### 6.2.2 PIGE

Neste trabalho as medidas de PIGE foram realizadas no acelerador Tandem de 3 MV do CTN/IST em Sacavém, Portugal. O acelerador Tandem é constituído pelos seguintes componentes: fonte Duoplasmatron, tubos de aceleração e tanque. A fonte Duoplasmatron produz um feixe de iões negativos, este é acelerado pelo acelerador e convertido para iões positivos a partir do canal Stripper [5].

A linha onde se realizou este trabalho é composta por um sistema de colimadores, uma gaiola de Faraday, um quadrulólo, defletores eletrostáticos, um colimador à entrada da câmara, a câmara de reações nucleares e um sistema de câmaras de vídeo. O sistema de vácuo da linha está dividido em

dois estágios, sendo o primeiro assegurado por uma bomba rotatória e por uma bomba turbomolecular da Pfeiffer e o segundo por uma bomba turbomolecular da Varian [5].

O detetor de radiação gama utilizado foi um detetor de Ge ultra puro. Estava revestido por uma capa de alumínio com 1 mm de espessura. Segundo a informação fornecida pelo fabricante o cristal de Ge apresenta 62,6 mm de espessura, 64 mm de diâmetro e uma camada inativa de 0,7 mm. A resolução e eficiência intrínseca do detetor são de 1,76 keV e 45%, respetivamente, para a deteção da linha de 1,33 MeV do  $^{60}\text{Co}$  com uma constante de tempo de 6  $\mu\text{s}$ . O detetor é arrefecido através de azoto líquido [5].

A análise quantitativa em PIGE foi realizada através do programa ERYA, sem o recurso de padrões e com o conhecimento prévio da secção eficaz da reação que se pretendia estudar. Primeiramente, devido ao fundo presente no espectro, corrigiram-se e normalizaram-se os rendimentos obtidos experimentalmente para todos os elementos para a carga coletada de 1  $\mu\text{C}$ , isto porque os cálculos executados no programa têm em conta essa carga. De seguida, introduziram-se as seguintes variáveis de entrada no ERYA, de forma, a ser possível calcular o rendimento: eficiência do detetor, secção eficaz da reação nuclear, parâmetros de Ziegler, composição inicial da amostra, a energia gama emitida, a energia inicial, a massa atómica e a carga coletada. Depois deste processo, era apresentado o rendimento experimental e o rendimento calculado pelo ERYA para cada elemento. Deste modo, procedeu-se ao cálculo da razão entre os dois rendimentos. Quando esta razão tinha um valor próximo de 1, então a fracção atómica dos elementos fornecida pelo ERYA podia ser aceite, procedendo-se de seguida à conversão para a fracção mássica. Por outro lado, quando a razão não apresentava um valor próximo de 1, então os parâmetros de entrada, nomeadamente a composição inicial da amostra, teriam de ser ajustados, para a obtenção de um novo rendimento através do ERYA.

## Capítulo 7

# Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados das medições realizadas, assim como a sua análise e discussão. Os resultados estão divididos pelos diferentes tipos de amostras, isto é, entre amostras de fêmur e amostras de ossos da articulação do cotovelo canino.

### 7.1 Cabeças de Fêmur

Como já foi dito na seção 6.1.2 foram analisadas 4 amostras de cabeças de fêmur, sendo duas de cão e as outras duas de gato. As amostras de cabeças de fêmur de cão foram analisadas por  $\mu - XRF$  e por PIGE, enquanto que as amostras de cabeças de fêmur de gato, devido a questões de falta de tempo de feixe, apenas foram analisadas através de  $\mu - XRF$ .

A tabela 7.1 apresenta os resultados obtidos através da análise pontual de  $\mu - XRF$  das duas amostras de cabeças de fêmur de cão, tendo sido uma conservada em formol e a outra em água destilada.

Tabela 7.1: Comparação da concentração elemental das cabeças de fêmur em água destilada e em formol obtida através de  $\mu - XRF$ .

Elemento	Cabeça de Fêmur em Água Destilada ( $\mu g.g^{-1}$ )	Cabeça de Fêmur em Formol ( $\mu g.g^{-1}$ )
Al	$300 \pm 50$	$243 \pm 120$
P	$122051 \pm 7000$	$94054 \pm 37000$
K	$151 \pm 30$	$147 \pm 37$
Ca	$281136 \pm 19000$	$226384 \pm 94000$
Fe	$9 \pm 3$	$55 \pm 40$
Zn	$173 \pm 50$	$167 \pm 50$
Sr	$107 \pm 40$	$96 \pm 40$
Ca/P	$2,32 \pm 0,15$	$2,60 \pm 0,40$

Analisando a tabela anterior verifica-se que, exceptuando o caso do Sr, existe um aumento da incerteza associada à quantificação dos elementos representados na amostra em formol, em comparação com a incerteza da quantificação da amostra em água destilada. Pode-se afirmar, ainda, que o formol não danificou a amostra, uma vez que o intervalo de valores da concentração de cada elemento da amostra em formol está contido no intervalo de valores da concentração do mesmo elemento da amostra em água destilada.

No estudo de PL. *et al* é referida a sublimação do formol quando é liofilizado, e mencionado que o formol forma cadeias poliméricas que não evaporam [47]. Assim, está explicado o facto de as incertezas aumentarem muito, pois efetivamente estamos a mudar a matriz. Por outro lado, poderá existir uma tendência para as concentrações aparentes diminuírem, também devido à mudança de matriz, por causa das cadeias poliméricas que ficam depositadas no osso.

Na Tabelas 7.2 e 7.3 estão representados os rendimentos experimentais obtidos através da técnica de PIGE para diferentes energias. Com estes valores é possível fazer uma análise qualitativa das amostras, e constatar que o P e Al (elementos comuns na análise das duas técnicas), para os dois valores diferentes de energia, apresentam uma relação de superioridade de P em relação ao Al, tanto na amostra de cabeça de fémur em formol como na amostra de cabeça de fémur em água destilada. Estes dados, permitem constatar a concordância entre as duas técnicas, uma vez que os dados obtidos através  $\mu - XRF$  (ver Tabela 7.1), verificam o mesmo comportamento desses elementos.

Tabela 7.2: Valores obtidos dos rendimentos experimentais do P e Al através da técnica de PIGE para uma energia de 3006,7 keV.

	P	Al
Fémur em Água Destilada	$6374 \pm 80$	$290 \pm 3$
Fémur em Formol	$5853 \pm 70$	$203 \pm 2$

Tabela 7.3: Valores obtidos dos rendimentos experimentais do P, Al,  $^{197}F$ ,  $^{110}F$ , Na e Mg através da técnica de PIGE para uma energia de 2788,2 keV.

	P	Al	$^{197}F$	$^{110}F$	Na	Mg
Fémur em Água Destilada	$3414 \pm 40$	$672 \pm 10$	$1625 \pm 20$	$934 \pm 20$	$3632 \pm 50$	$78 \pm 2$
Fémur em Formol	$3105 \pm 40$	$576 \pm 10$	$1464 \pm 20$	$804 \pm 10$	$3894 \pm 50$	$68 \pm 2$

A seguir, estão representados os gráficos com os dados obtidos, através das medidas pontuais efetuadas utilizando a técnica  $\mu - XRF$ , das cabeças de fémur de gato. Observando os gráficos a) e b) da Figura 7.1 verifica-se que o tratamento da amostra em água oxigenada ou formol não teve interferência significativa nos resultados obtidos. Por outro lado, analisando os gráficos c) e d) que correspondem ao Fémur 2, facilmente se observa que também neste caso o diferente tratamento da amostra, água destilada e formol, não afetou os resultados finais. Assim sendo, com estes resultados podemos concluir que as soluções de formol e água oxigenada, neste caso, não invalidaram as amostras.

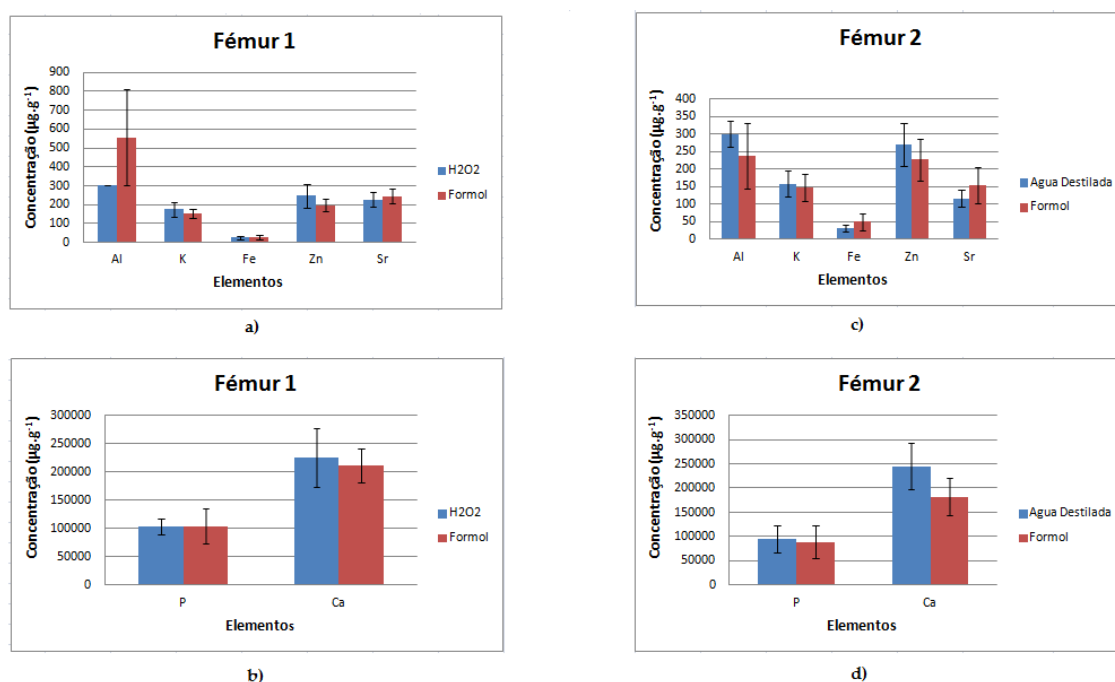


Figura 7.1: Dados obtidos das amostras de fémur de gato. Nos gráficos a) e b) estão representadas as concentrações dos respetivos elementos<sup>1</sup> do Fémur 1, enquanto que os gráficos c) e d) representam os valores obtidos para a quantificação do Fémur 2.

<sup>1</sup>Note-se que a concentração do Ca e do P não pode ser representada no mesmo gráfico que os restantes elementos, uma vez que apresentam diferente ordem de grandeza.

Os resultados obtidos através das cabeças de fémur de cão e de gato estão concordantes no sentido em que o formol não condicionou as amostras ósseas, independentemente do tempo que a amostra esteve contida nele. No caso da amostra de cão foi durante um ano enquanto que a amostra de gato foi durante 20 dias. Por outro lado, com a análise das cabeças de fémur do gato, foi possível concluir-se também que após a amostra estar 20 dias armazenada em água oxigenada, não sofreu alterações. No contexto deste trabalho, este facto é bastante importante, uma vez que três das amostras doentes, estiveram armazenadas precisamente em água oxigenada.

## 7.2 Ossos da Articulação do Cotovelo Canino

Para o estudo da displasia do cotovelo canino, como foi referido na secção 6.1.1, temos o conjunto de 4 amostras doentes e uma de controlo. As amostras doentes foram conservadas de forma diferente até a sua análise, três em água oxigenada e a outra em água destilada. A amostra de controlo foi mantida também em água destilada.

De acordo com os dados do estudo de J. Aerssens *et al* que tinha como objetivo comparar os parâmetros composição, densidade e qualidade de amostras ósseas de sete vertebrados nomeadamente, cão, porco, vaca, ovelha, galinha, rato e humano, concluiu-se que as características do osso do cão são muito semelhantes às propriedades do osso humano [48]. Deste modo, neste trabalho serão utilizados como meio de comparação valores conhecidos da literatura da composição de ossos humanos.

A Figura 7.2 e a Tabela 7.4 representam os resultados obtidos após uma primeira análise pontual das amostras doentes e controle no estado normal<sup>1</sup>, através da técnica de  $\mu - XRF$ .

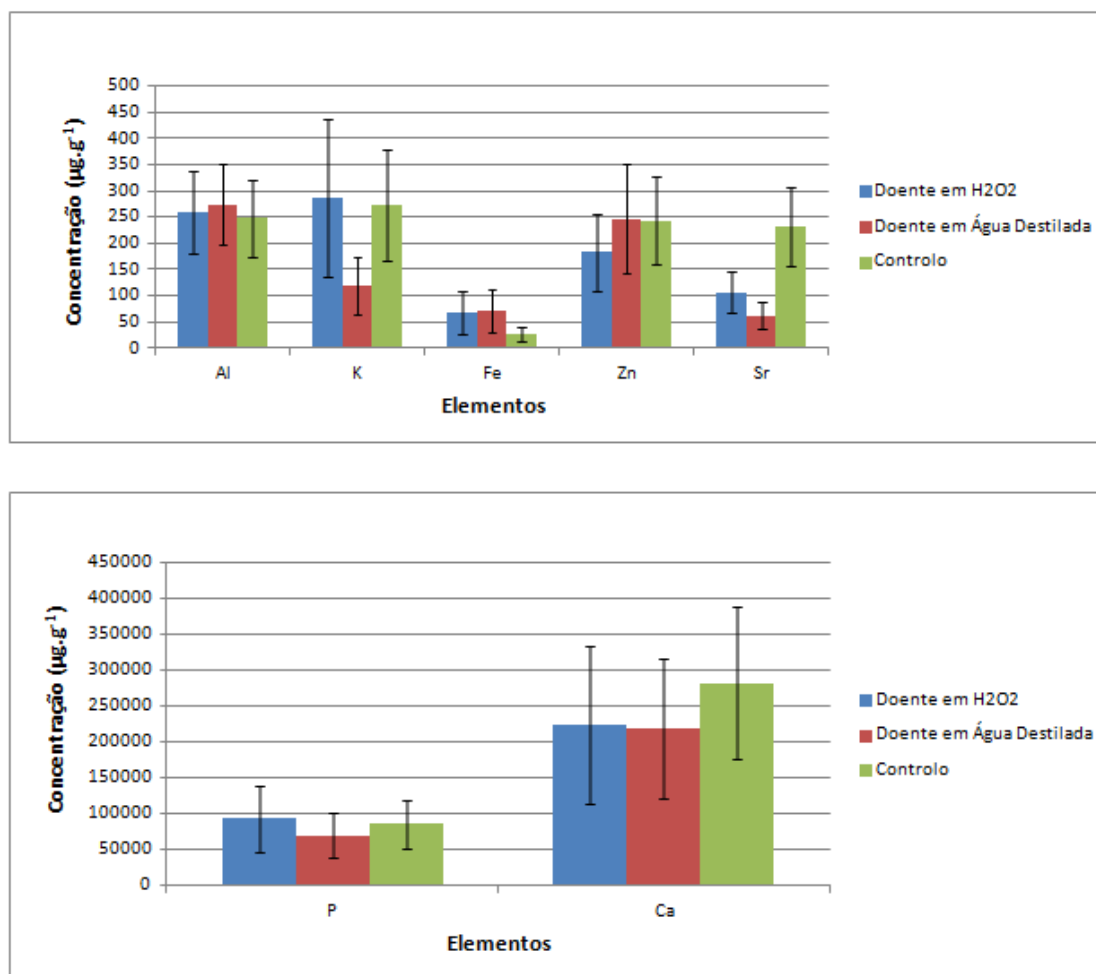


Figura 7.2: Dados obtidos das amostras doentes e de controle do cotovelo canino.

Tabela 7.4: Valores obtidos para a razão Ca/P.

	Controle	Doente em Água Destilada	Doente em $H_2O_2$
Ca/P	$3,42 \pm 0,60$	$3,19 \pm 0,75$	$3,43 \pm 1,20$

Observando os gráficos da Figura 7.2 é evidente que as amostras doentes apresentam menor concentração de Sr comparativamente com a amostra controle.

Tendo em consideração os valores da literatura relativamente à concentração do Sr em ossos humanos [49], o intervalo de valores obtido para a concentração desse elemento na amostra controle ( $233 \pm 75 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) garante a validade da amostra. Por outro lado, os valores baixos obtidos para a concentração de Sr nas amostras doentes poderão sugerir uma interferência na formação óssea ao nível da diferenciação celular [50], o que realmente é bastante interessante, e não se estava à espera.

<sup>1</sup>Note-se que entende-se por estado normal das amostras, o seu estado natural, ou seja, rugoso, e sem forma constante.



A quantidade de Ca e P é crítica para a manutenção da homeostase mineral e do metabolismo ósseo. A co-dependência entre o Ca e P é evidente para o crescimento e desenvolvimento do osso, sendo portanto a Ca/P um adequado biomarcador para a avaliação da saúde dos ossos[51]. Considerando a estequiometria da hidroxiapatita, espera-se uma Ca/P de 2,16 [51, 52]. Observando a Tabela 7.4 verifica-se que o valor obtido para a Ca/P dos três diferentes tipos de amostra é bastante superior ao esperado. Supôs-se que a rugosidade e porosidade das amostras poderiam ser duas das causas para se terem obtido estes resultados. Isto porque, devido à porosidade da amostra, se o feixe incide numa cavidade então haverá uma atenuação diferenciada do P e do Ca, provocando um aumento na Ca/P. Por outro lado a rugosidade da amostra e a sua forma não plana pode provocar desvios no feixe o que implica que este não esteja a incidir no ponto que inicialmente se escolheu ou podendo mesmo nem estar a incidir na própria amostra. Por estas razões e pelas incertezas associadas à técnica de  $\mu$ -XRF referidas nos Capítulos 4 e 6, sentiu-se a necessidade de uma nova medição das amostras doentes e de controlo mas neste caso, essas amostras foram pastilhadas antes da sua análise.

Tabela 7.5: Comparação dos valores de concentração obtidos, em  $\mu g.g^{-1}$ , para as amostras no estado normal e pastilhado.

		Controlo	Doente em Água Destilada	Doente em Água Oxigenada
Al	Amostra Normal	248 $\pm$ 80	273 $\pm$ 80	260 $\pm$ 80
	Amostra Pastilhada	285 $\pm$ 70	268 $\pm$ 110	319 $\pm$ 80
P	Amostra Normal	85463 $\pm$ 35000	69633 $\pm$ 31000	92889 $\pm$ 47000
	Amostra Pastilhada	98811 $\pm$ 19000	111035 $\pm$ 10000	110817 $\pm$ 44000
K	Amostra Normal	273 $\pm$ 110	119 $\pm$ 60	287 $\pm$ 150
	Amostra Pastilhada	177 $\pm$ 40	140 $\pm$ 40	269 $\pm$ 120
Ca	Amostra Normal	281008 $\pm$ 107000	218843 $\pm$ 99000	223682 $\pm$ 109000
	Amostra Pastilhada	248444 $\pm$ 47000	258966 $\pm$ 24000	259063 $\pm$ 34000
Fe	Amostra Normal	28 $\pm$ 20	72 $\pm$ 50	68 $\pm$ 40
	Amostra Pastilhada	13 $\pm$ 10	8 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3
Zn	Amostra Normal	243 $\pm$ 90	247 $\pm$ 110	183 $\pm$ 80
	Amostra Pastilhada	167 $\pm$ 40	244 $\pm$ 30	233 $\pm$ 30
Sr	Amostra Normal	233 $\pm$ 80	63 $\pm$ 30	107 $\pm$ 40
	Amostra Pastilhada	159 $\pm$ 20	50 $\pm$ 10	73 $\pm$ 20
Ca/P	Amostra Normal	3,42 $\pm$ 0,60	3,19 $\pm$ 0,75	3,43 $\pm$ 1,20
	Amostra Pastilhada	2,48 $\pm$ 0,15	2,40 $\pm$ 0,15	2,75 $\pm$ 0,75

Analisando a Tabela 7.5 é evidente que com a excepção do Al da amostra doente em água destilada, em todos os restantes elementos os valores obtidos de concentração apresentam uma incerteza menor quando as amostras estão na forma de pastilha. Verifica-se, também, que a quantificação de determinados elementos nas amostras pastilhadas melhorou, sendo o Ca e P exemplos disso. A razão Ca/P comprova precisamente esse facto, uma vez que para os diferentes tipos de amostra houve uma melhoria significativa nessa razão quando as amostras foram pastilhadas. Contudo, embora os valores das razões entre Ca e P tenham melhorado quando as amostras foram pastilhadas, continuam afastados do valor esperado 2,16. No entanto, os resultados obtidos para as Ca/P podem ser comparados com os resultados do estudo realizado por Tzaphlidou, (2002), que indicam que a Ca/P para

ossos saudáveis das costelas humanas de mulheres e homens são 2.33 e 2.35, respetivamente. O mesmo estudo mostrou que as diferenças entre o valor estequiométrico e os valores obtidos é devido à presença de gordura óssea e lípidos [52], o que poderemos associar a este caso.

Relativamente ao Zn, é observável na tabela, que para o caso em que as amostras estão pastilhadas, as amostras doentes apresentam mais Zn que a amostra controlo. Tendo em conta os resultados da literatura [49], o valor obtido para a concentração de Zn da amostra controlo,  $167 \pm 36 \mu\text{g.g}^{-1}$ , permite validar a amostra.

O Zn é um elemento traço essencial em vários processos biológicos e a sua indução reduzida pode causar doenças crónicas. Está também presente no tecido ósseo, apresentando um papel importante no seu metabolismo e é considerado um componente essencial da matriz calcificada. Embora o Zn seja incorporado simultaneamente com o Ca durante a mineralização, não há correlação entre o Zn e o grau de mineralização. Isto está de acordo com as investigações de Lappalainen et al [53] que mostraram que o Ca não é um fator significativo para explicar as concentrações de Zn no osso. Deste modo, é sugerido que o Zn funciona como um controlo homeostático .

Sabe-se que a deficiência de Zn é comum nos países subdesenvolvidos e está principalmente associada com a desnutrição, afetando o sistema imunológico, cicatrização de feridas, o paladar e olfacto, e a síntese de DNA. Ou seja, a deficiência de Zn pode levar a condições patológicas que poderão ser prevenidas ou revertidas através de suplementação. Por outro lado, suplementos têm de ser controlados devido aos seus efeitos tóxicos nas funções biológicas [54]. Seria necessário uma análise de mais amostras para se poder perceber o comportamento do Zn, uma vez que, tal como no caso do Sr, estes resultados podem ser realmente interessantes.

Procedeu-se ainda a uma segunda medição das amostras pastilhadas, mas neste caso através da análise da área de interesse ao invés de pontos de interesse. Na Figura 7.2 estão representados os resultados obtidos.

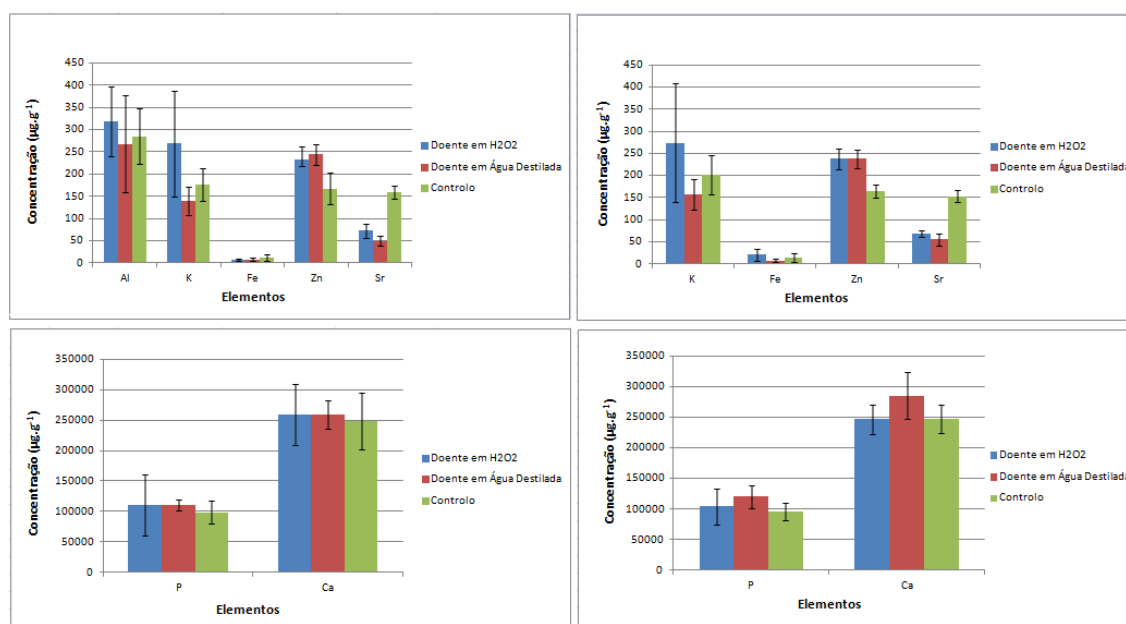


Figura 7.3: Dados obtidos das amostras doentes e de controlo pastilhadas. Os gráficos da esquerda representam os dados obtidos para a análise pontual das amostras, enquanto os gráficos da direita representam os dados obtidos para a análise da área de interesse das amostras.

Comparando os gráficos correspondentes à análise pontual e através de áreas, verifica-se que quando se opta por escolher a área de interesse não é possível a quantificação do Al. É ainda observável, que relativamente aos restantes elementos não se verificou diferenças significativas entre as duas análises, podendo concluir-se que entre uma análise pontual das amostras normais e das amostras pastilhadas verifica-se uma melhoria significativa na quantificação através de  $\mu - XRF$  quando as amostras estão pastilhadas, mas por outro lado, não há vantagem numa análise através de áreas de interesse nas amostras pastilhadas.

Embora os dados obtidos através da técnica de PIGE não tenham sido o que se esperava pelos motivos explicados na seção 7.1, de seguida são apresentados os rendimentos experimentais para a amostra de controlo e uma das amostras doentes em água oxigenada.

Tabela 7.6: Valores obtidos dos rendimentos experimentais da amostra de controlo através da técnica de PIGE, para uma energia de 2788 keV.

Rendimento Experimental	
P	$2221 \pm 30$
$^{197}F$	$4823 \pm 60$
$^{110}F$	$2783 \pm 40$
Na	$5313 \pm 70$
Mg	$56 \pm 2$
Li	$40 \pm 1$

Tabela 7.7: Valores obtidos dos rendimentos experimentais da amostra doente em água oxigenada através da técnica de PIGE, para uma energia de 3006,7 keV.

Rendimento Experimental	
P	$6301 \pm 70$
197F	$2991 \pm 33$
110F	$1340 \pm 15$
Na	$5083 \pm 57$
Mg	$24 \pm 1$

As medições realizadas através de PIGE na amostra de controlo e doente em água oxigenada foram realizadas a diferentes energias, logo não se pode comparar os rendimentos experimentais. Contudo, observado a Tabela 7.6 e 7.7 podemos deduzir que a amostra controlo apresenta mais F, Na, e Mg que a amostra doente, isto porque embora a amostra de controlo tenha sido sujeita às medições a uma energia inferior, apresenta valores de rendimentos experimentais, para esses elementos, superiores à amostra doente.

## Capítulo 8

# Conclusões e Perspetivas Futuras

Com este trabalho pretendia-se estudar a displasia do cotovelo canino, nomeadamente a fratura do processo coronoide que é a patologia mais incidente. Embora esta fratura esteja bastante presente nos dias de hoje em cães de raças de médio e grande porte, o seu diagnóstico e posterior tratamento cirúrgico são bastante dispendiosos, o que leva efetivamente a que a grande maioria dos cães não sejam tratados. Este é, de facto, um problema recorrente, pelo qual este próprio trabalho padecia, pois ao longo destes 6 meses foram marcadas várias cirurgias que acabaram por ser desmarcadas pelos proprietários. Assim sendo, um dos grandes problemas do estudo da displasia do cotovelo em canídeos, precisamente, a falta de cirurgias e consequentemente de amostras doentes para análise.

Neste trabalho, as amostras foram analisadas através das técnicas de  $\mu - XRF$  e PIGE. Para o estudo da fractura do coronóide medial dos cães analisaram-se quatro amostras doentes de cotovelo canino e uma amostra de controlo. Para o estudo do tratamento de amostras com formol e água oxigenada analisaram-se 2 cabeças de fémur de cão e outras 2 de gato.

Através da técnica de PIGE não foram possíveis análises quantitativas devido a atrasos no cálculo da secção eficaz do P. Por outro lado, através dos resultados obtidos através da técnica de  $\mu - XRF$  foi possível verificar que as amostras de cabeças de fémur de cão quando armazenadas em formol até à sua análise não foram danificadas. No mesmo seguimento, as amostras de cabeças de fémur de gato, mantidas em formol e água oxigenada, também não sofreram alterações até serem analisadas. Estes resultados mostraram-se interessantes, uma vez que perspetivava-se uma possível alteração das amostras quando conservadas em água oxigenada e formol.

Relativamente às amostras correspondentes ao cotovelo canino, através da técnica de  $\mu - XRF$ , foi possível apurar que as amostras doentes apresentam uma menor concentração de Sr e, por outro lado uma maior concentração de Zn, relativamente à amostra controlo.

A técnica de  $\mu - XRF$  apresenta algumas incertezas associadas, principalmente quando o tipo de amostra em estudo apresenta rugosidades e porosidade, como é o caso das amostras do presente trabalho. Precisamente por esta razão, as amostras foram pastilhadas, e os resultados mantiveram-se consistentes no sentido da diminuição de Sr e aumento de Zn nas amostras doentes, relativamente à amostra de controlo.

Embora o número de amostras estudadas neste trabalho seja diminuto, as variações de Sr e Zn parecem reais. E ao sê-lo, é a primeira vez que estas alterações são observadas, estando neste

momento a escrever-se um artigo científico para publicar estes resultados promissores e relevantes.

É importante que surjam novos estudos acerca desta doença, inclusive análises ósseas com diferentes técnicas, possibilitando a descoberta de eventuais dados novos, tal como aconteceu neste estudo. Desta forma, será alcançado um maior conhecimento acerca da causa da fractura e, consequentemente, aplicado um tratamento mais direccionado e eficaz.

# Bibliografia

- [1] I. C. Mariee, a. Gröne, and L. F. H. Theyse, “The role of osteonecrosis in canine coronoid dysplasia: arthroscopic and histopathological findings,” *Vet. J.*, vol. 200, pp. 382–6, Jun 2014.
- [2] J. Temwichitr, P. a. J. Leegwater, and H. a. W. Hazewinkel, “Fragmented coronoid process in the dog: a heritable disease,” *Vet. J.*, vol. 185, pp. 123–9, Aug. 2010.
- [3] C. Hurlbeck, R. Einspanier, I. Pfeil, and a. Bondzio, “Evaluation of biomarkers for osteoarthritis caused by fragmented medial coronoid process in dogs,” *Res. Vet. Sci.*, vol. 96, pp. 429–35, Jun 2014.
- [4] Bruker, M4 Tornado - Physical Principles of Micro-X-ray Fluorescence. Bruker AXS Microanalysis, 2009.
- [5] M. M. L. Fonseca, *Análise de Elementos Leves Por Reações Nucleares Com Produção de Radiação Gama*. Faculdade de ciências e tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2010.
- [6] G. M. Constantinescu and I. a. Constantinescu, “A clinically oriented comprehensive pictorial review of canine elbow anatomy,” *Vet. Surg.*, vol. 38, pp. 135–43, Feb. 2009.
- [7] I. P. Areán, *Estudio Comparativo de la displasia de codo en el perro, mediante exploración clínica, radiológica, artroscópica e tomografía axial computadorizada*. PhD thesis, Universidad de León, 2010.
- [8] A. Coulson and N. Lewis, *An Atlas of Interpretative Radiographic Anatomy of the Dog & Cat*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, Apr. 2002.
- [9] H. E. Evans and A. Lahunta, *Miller’s Anatomy of the Dog*. Elsevier, fourth ed., 2013.
- [10] H. E. Evans and A. Lahunta, *Guide to the Dissection of the Dog*. Saunders, seventh ed., 2010.
- [11] S. Breit, W. Künzel, and S. Seiler, “Variation in the ossification process of the anconeal and medial coronoid processes of the canine ulna,” *Res. Vet. Sci.*, vol. 77, pp. 9–16, Aug. 2004.
- [12] H. A. W. Hazewinkel, “International elbow working group,” 2009.
- [13] P. Medicine, “Etiology and Pathogenesis of Osteochondrosis,” vol. 448, pp. 429–448, 2007.
- [14] D. Slater, *Textbook of Small Animal Surgery*. Elsevier, third ed., 2003.
- [15] C. R. A. Ferrigno, A. Schmaedecke, F. A. Sterman, and J. Lincoln, “Treatment of ununited anconeal process in 8 dogs by osteotomy and dynamic distraction of the proximal part of the ulna,” vol. 27, pp. 352–356, Aug. 2007.

- 
- [16] A. Ribeiro, O Uso de Artroscopia no Diagnóstico e Tratamento da Displasia do Cotovelo Canino. PhD thesis, Universidade Técnica de Lisboa, 2011.
- [17] I. Elbow and W. Group, “21 th annual meeting of the,” 2006.
- [18] Y. Samoy, I. Gielen, H. V. Bree, and B. V. Ryssen, “Dysplastic elbow diseases in dogs,” pp. 327–338, 2011.
- [19] N. J. Burton, M. J. Perry, N. Fitzpatrick, and M. R. Owen, “Comparison of Bone Mineral Density in Medial Coronoid Process of Dogs With and Without Medial Coronoid Process Fragmentation,” *AJVR*, vol. 71, pp. 41–46, Jan. 2012.
- [20] I. C. M. Lavrijsen, H. C. M. Heuven, G. Voorhout, B. P. Meij, L. F. H. Theyse, P. a. J. Leegwater, and H. a. W. Hazewinkel, “Phenotypic and genetic evaluation of elbow dysplasia in Dutch Labrador Retrievers, Golden Retrievers, and Bernese Mountain dogs,” *Vet. J.*, vol. 193, pp. 486–92, Aug. 2012.
- [21] S. F. Lau, C. F. Wolschrijn, H. a. W. Hazewinkel, M. Siebelt, and G. Voorhout, “The early development of medial coronoid disease in growing Labrador retrievers: radiographic, computed tomographic, necropsy and micro-computed tomographic findings,” *Vet. J.*, vol. 197, pp. 724–30, Sept. 2013.
- [22] E. Ludewig and M. L. D. Arruda, “Use of arthroscopy in the treatment of fragmented medial coronoid process of the ulna : case report in a dog,” *Braz J vet Resanim Sci*, vol. 42, pp. 388–390, 2005.
- [23] R. Eisberg, *Fundamentals of Modern Physics*. John Wiley, first ed., 1961.
- [24] A. A. Markowics and R. E. V. Grieken, *Handbook of X-Ray Spectrometry*. Marcell Dekker, 2 ed., 2002.
- [25] H. P. Klug and L. E. Alexander, *X-Ray Diffraction Procedures*. John Wiley, 2 ed., 1974.
- [26] E. P. Bertin, *Principles and Practice of X-Ray Spectrometric Analysis*. Plenum Press, 2 ed., 1975.
- [27] D. A. Skoog and D. M. West, *Principles of Instrumental Analysis*. Saunders College, 2 ed., 1980.
- [28] A. Williams and H. Günzler, *Handbook of Analytical Techniques*. Wiley VCH, first ed., 2001.
- [29] University of North Carolina, “Analytical X-Ray Training: Production of X-Rays.”
- [30] R. Jenkins and R. L. Snider, *Introduction to X-Ray Powder Diffractometry*. 1996.
- [31] R. Klockenkämper and A. V. Bohlen, *Total-Reflection X-ray Fluorescence Analysis and Related Methods*. John Wiley, 2 ed., 2015.
- [32] J. Als-Nielsen and D. McMorrow, *Elements of Modern X-ray Physics*. John Wiley, 2 ed., 2011.
- [33] D. N. Papadopoulou, G. a. Zachariadis, a. N. Anthemidis, N. C. Tsirliganis, and J. a. Stratis, “Development and optimisation of a portable micro-XRF method for in situ multi-element analysis of ancient ceramics,” *Talanta*, vol. 68, pp. 1692–9, Feb. 2006.



- [34] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. David Harris, 6 ed., 2007.
- [35] P. Wobrauschek, C. Streli, and E. S. Lindgren, "Fluorescence Analysis," pp. 1–17, 2010.
- [36] J. G. Ferreira and M. T. Ramos, *X-Ray Spectroscopy in Atomic and Solid State Physics*. Plenum, 1988.
- [37] B. Beckhoff, B. Kanngieß er, N. Langhoff, R. Wedell, and H. Wolff, *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*. Springer, 2006.
- [38] Bruker, M4 Tornado - User Manual. Bruker Nano GmbH, 2009.
- [39] A. Moreno, *Non-destructive Characterization of Artworks in Paper Support Using Spectroscopic Techniques*. PhD thesis, Universidade de Lisboa, 2013.
- [40] K. S. Krane, *Introductory Nuclear Physics*. John Wiley & Sons, 1988.
- [41] L. S. Martins, *Programa para análise em profundidade por técnicas nucleares*. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciência e tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2013.
- [42] F. V. C. Lourenço, *A Reacção Nuclear  $^{23}\text{Na}(p,p'\gamma)^{23}\text{Na}$  - Optimização da Linha de PIGE do Acelerador Tandem de 3 MV da UFA-ITN*. Faculdade de ciências e tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2011.
- [43] L. Lin, S. Mateo, P. D. Sherman, I. Consultant, and S. Jose, "Cleaning Data the Chauvenet Way," no. c, pp. 1–11.
- [44] M. Baalousha, "Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter.," *Sci. Total Environ.*, vol. 407, pp. 2093–101, Mar. 2009.
- [45] E. Curis, J. Osán, G. Falkenberg, S. Bénazeth, and S. Török, "Simulating systematic errors in X-ray absorption spectroscopy experiments: Sample and beam effects," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 60, pp. 841–849, Jul 2005.
- [46] T. Phenrat, N. Saleh, K. Sirk, R. D. Tilton, and G. V. Lowry, "Aggregation and Sedimentation of Aqueous Nanoscale Zerovalent Iron Dispersions," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, pp. 284–290, Jan. 2007.
- [47] P. Altieri, S. Berman, and J. Lowenthal, "Sublimation of formadehyde in freeze-drying," 1976.
- [48] J. A. N. Dequeker, "Interspecies Differences in Bone Composition , Density , and Quality : Potential Implications for in Vivo Bone Research," *The endocrine society*, vol. 139, no. 2, 1998.
- [49] M. L. Carvalho, A. F. Marques, and J. Brito, "Synchrotron Radiation and Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Applications on Elemental Distribution in Human Hair and Bones," 2003.
- [50] S. C. Verberckmoes, M. E. Broe, and P. D'Hase, "Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization," vol. 64, pp. 534–543., 2003.
- [51] N. Kourkoumelis, I. Balatsoukas, and M. Tzaphlidou, "Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy," *J. Biol. Phys.*, vol. 38, pp. 279–91, Mar. 2012.

- [52] W. Kaabar, O. Gundogdu, O. Bunk, F. Pfeiffer, and M. J. F. M. Webb, "Compositional studies at the Bone-Cartilage interface using PIXE , RBS and cSAXS techniques," 2008.
- [53] B. Pemmer, a. Roschger, a. Wastl, J. G. Hofstaetter, P. Wobrauschek, R. Simon, H. W. Thaler, P. Roschger, K. Klaushofer, and C. Streli, "Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue.," *Bone*, vol. 57, pp. 184–93, Nov. 2013.
- [54] C. G. Fraga, "Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health.," *Mol. Aspects Med.*, vol. 26, no. 4-5, pp. 235–44, 2005.